

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA DUTRA MINOZZO

PARÂMETROS SÉRICOS E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BOVINOS  
COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA

Curitiba

2018

CAROLINA DUTRA MINOZZO

PARÂMETROS SÉRICOS E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BOVINOS  
COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Coorientadora: Prof. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos  
Schmidt

CURITIBA

2018

M666p

Minozzo, Carolina Dutra

Parâmetros séricos e proteínas de fase aguda em bovinos com hematúria enzoótica / Carolina Dutra Minozzo. - Curitiba, 2018. 129 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Ivan Roque De Barros Filho

Coorientadora: Elizabeth Moreira Dos Santos Schmidt

1. Hematologia veterinária. 2. Plantas venenosas para o gado. 3. Samambaia. 4. Vaca. I. Barros Filho, Ivan Roque De (Orientador). II. Schmidt, Elizabeth Moreira Dos Santos (Coorientadora). III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA DUTRA MINOZZO** intitulada: **PARÂMETROS SÉRICOS E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BOVINOS COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovada no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Abril de 2018.

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LEANDRO CAVALCANTE LIPINSKI

Avaliador Externo (UEPG)

JOÃO HENRIQUE PEROTTA

Avaliador Externo (UFPR/DMV)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e oportunidades maravilhosas.

A minha mãe Mônica, pelo amor e paciência ímpares, por todos os anos de dedicação e pelo esforço incansável para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu pai Jayme, por todo amor e companheirismo como pai e Médico Veterinário. Por ter sido o meu primeiro professor e por ter me ensinado a amar os animais.

A minha irmã e melhor amiga Letícia, por tudo o que passamos sempre juntas e com bom humor.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ivan Barros, o qual admiro como pessoa, professor, Médico Veterinário, por todos os ensinamentos e conselhos.

A profa. Dra. Elizabeth M. dos Santos Schmidt, pela coorientação desse trabalho, disponibilidade e gentileza.

Aos meus queridos professores Juliana S. Brum, João Henrique Perotta e Julia A. Galvão, pelo carinho e enorme contribuição para minha formação como Médica Veterinária.

A melhor amiga que o mestrado poderia me reservar, Bárbara Barbi de Freitas, pelos momentos indescritíveis que passamos juntas.

Aos amigos da faculdade e aqueles que o mestrado me proporcionou, em especial, Bruna Natali, Bruna Zielinski, Luiza C. Barcellos, Rafaela Talini e Angélica, pelo apoio e carinho.

A Universidade Federal do Paraná, pela minha formação como Médica Veterinária e agora pelo mestrado, e por ser a casa de todos os Médicos Veterinários da família Minozzo.

A equipe do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR pela ajuda, apoio técnico no processamento das amostras e pela amizade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

E enfim, a todas as pessoas e animais que participaram desses anos de formação e ajudaram a tornar o meu sonho possível.

*“Dovunque tu non puoi amare, non tardare”*

*Eleonora Duse*

## RESUMO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma toxicose associada a ingestão crônica de pequenas quantidades de samambaia (*Pteridium* spp.). O principal composto tóxico em *Pteridium* spp. é o ptaquilosídeo (Pt), um glicosídeo carcinogênico capaz de induzir alterações hiperplásicas e neoplásicas na vesícula urinária nos bovinos. Clinicamente a doença se caracteriza por hematúria contínua ou intermitente e anemia, culminando no óbito do animal ou no seu descarte. Não há tratamento conhecido para a doença e sua prevenção é preconizada. A HEB tem distribuição mundial e já foi descrita em vários estados brasileiros. No Paraná ocorre em muitos municípios, inclusive na Região Metropolitana de Curitiba, onde foi desenvolvido esse estudo. Assim, objetivou-se estudar os parâmetros bioquímicos séricos e proteínas de fase aguda (PFA) em bovinos naturalmente intoxicados por *Pteridium* spp. e com HEB. Essa dissertação é dividida em dois capítulos. O primeiro abrange uma revisão bibliográfica sobre a HEB e os principais parâmetros hematológicos analisados nos bovinos, com ênfase na PFA haptoglobina (Hp). O segundo capítulo traz o estudo intitulado “Parâmetros bioquímicos séricos e proteínas de fase aguda em bovinos com hematúria enzoótica”, o qual compara os parâmetros hematológicos, séricos e a dinâmica da PFA Hp em bovinos saudáveis e com HEB oriundos de propriedades da Região Metropolitana de Curitiba e da Região do Vale do Ribeira, onde a doença é prevalente. A conclusão obtida nessa pesquisa foi de que os bovinos com HEB apresentam alterações significativas no eritrograma, leucograma, em alguns parâmetros séricos e na concentração de Hp, quando comparados à indivíduos saudáveis.

**Palavras chave:** plantas tóxicas; parâmetros hematológicos; vacas; haptoglobina.

## ABSTRACT

Bovine enzootic haematuria (BEH) is a toxicose associated with the chronic ingestion of small amounts of bracken fern (*Pteridium* spp.). The main toxic compound in *Pteridium* spp. is ptaquiloside (Pt), a carcinogenic glycoside capable of inducing hyperplasic and neoplastic changes in cattle urinary bladder. Clinically the disease is characterized by continuous or intermittent haematuria and anemia, culminating in the death of the animal or its disposal. There is no known treatment for the disease and its prevention is advocated. BEH has a worldwide distribution and has been described in several Brazilian states. In Paraná State it occurs in many municipalities, including the Metropolitan Region of Curitiba, where this study was developed. Thus, the objective was to study serum biochemical parameters and acute phase proteins (APP) in cattle naturally intoxicated with *Pteridium* spp. and with BEH. This dissertation is divided into two chapters. The first one covers a literature review about BEH and the main hematological parameters analyzed in cattle, with emphasis on PFA haptoglobin (Hp). The second chapter presents the study entitled "Serum biochemical parameters and acute phase proteins in cattle with enzootic haematuria", which compares the hematological, serum and APP Hp dynamics in healthy and BEH cattle from Metropolitan Region of Curitiba and the Ribeira Valley Region, where the disease is prevalent. The conclusion reached in this study was that cattle with BEH presented significant alterations in erythrogram, leukogram, in some serum parameters and in the Hp concentration, when compared to healthy individuals.

**Keywords:** toxic plants; hematological parameters; cow; haptoglobin.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Classificação taxonômica, linhagem e distribuição do gênero <i>Pteridium</i> spp. Adaptado de Der <i>et al.</i> (2009) e Thomson, Mickel e Mehltreter (2008). .....	18
Figura 1. Estrutura química do ptaquilosídeo e alterações da molécula conforme o pH do meio. Fonte: Adaptado de Shahin <i>et al.</i> (1998).....	25
Figura 2. Parâmetros hematológicos em vacas com macrohematúria (Macro) e em vacas com microhematúria (Micro). Linhas horizontais representam a mediana e o intervalo interquartil. (A) eritrócitos; (B) hematócrito; (C) hemoglobina; (D) leucócitos totais; (E) neutrófilos segmentados; (E) proteínas plasmáticas totais (PPT). * $p < 0,05$ .....	79
Figura 3. Parâmetros bioquímicos e atividade sérica de enzimas em vacas com macrohematúria (Macro), microhematúria (Micro) e no grupo controle (Gc). Linhas horizontais representam a mediana e o intervalo interquartil. (A) proteínas séricas totais; (B) globulinas; (C) haptoglobina; (D) AST; (E) CK. * $p < 0,05$ . .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Urinálise de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%). Escores estabelecidos para as análises: coloração (1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho); aspecto (1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo; 4= presença de coágulo); proteinúria e sangue oculto (1= negativo; 2= positivo). No sedimento: hemácias (1= ausência (<6/CMA); 2= presença (>7/CMA); 3= abundante (>100/CMA)), leucócitos (1= negativo (<3/CMA); 2= positivo (>4/CMA)), células de descamação epitelial (1= ausência (0/CMA); 2= ocasional (<2/CMA), 3= moderado (>3/CMA), 4= abundante (>5/CMA)), e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença). Na citologia: hemácias (1= ausência (<6/CMA); 2= presença (>7/CMA)) e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).....	81
Tabela 2. Hematologia de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%). .....	82
Tabela 3. Leucograma de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%). .....	82
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos e haptoglobina em vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro), com microhematúria (Gmicro) e bovinos saudáveis (Gc). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%).....	83

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AST – aspartato aminotransferase

BRSV – pelos vírus da doença respiratória sincicial bovina

BVD – diarreia viral bovina

CEUA - comissão de ética no uso de animais

CMA – campo de maior aumento

CVDS – carcinoma das vias digestivas superiores

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CK – creatina quinase

DH – diátese hemorrágica

dL – decilitros

fL – fentolitros

g – gramas

Gc – grupo controle

GGT – gama glutamiltransferase

Gmacro – grupo macrohematúria

Gmicro – grupo microhematúria

Hb – hemoglobina

HCM – hemoglobina corpuscular média

He – hemácias

HEB – hematúria enzoótica bovina

Hp – haptoglobina

Ht – hematócrito

IG – intragástrica

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

IV – intravenosa

KDa – quilodáltons

Km – quilômetros

MG – Minas Gerais

L – litros

mL – mililitros

mm – milímetros

N:L – relação neutrófilos/linfócitos

PFA – proteína de fase aguda

PON – paraoxonase

PR – Paraná

PPT – proteína plasmática total

Pt – ptaquilosídeo

PT – Proteína sérica total

Pta – Ptaquilosídeo ativado

RFA – resposta de fase aguda

SAA – amiloide-A sérica

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UI – unidades internacionais

VCM – Volume corpuscular médio

% - percentual

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2.3 HIPÓTESES .....	16
<b>3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
3.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE <i>Pteridium</i> spp. ....	17
3.2 PRINCÍPIOS ATIVOS TÓXICOS DE <i>Pteridium</i> spp. ....	21
3.2.1 Ácidos fenólicos e taninos .....	22
3.2.2 Tiaminases .....	23
3.2.3 Compostos cianogênicos .....	24
3.2.4 Compostos iludanos .....	24
3.3 EFEITOS TÓXICOS DO PTAQUILOSÍDEO NOS SERES HUMANOS .....	28
3.4 DOENÇAS CAUSADAS PELOS PRINCÍPIOS RADIOMIMÉTICOS DE <i>Pteridium</i> spp. NOS BOVINOS .....	31
3.4.1 Síndrome hemorrágica aguda .....	31
3.4.2 Hematúria enzoótica dos bovinos e carcinoma das vias digestivas superiores .....	34
3.5 PRINCIPAIS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS NOS BOVINOS .....	40
3.5.1 Hemograma .....	41
3.5.2 Parâmetros bioquímicos séricos .....	42
3.6 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA .....	45
3.6.1 Haptoglobina bovina .....	47
3.7 REFERÊNCIAS .....	52
<b>4. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>69</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	71
4.2.1 Seleção das propriedades e dos animais .....	71
4.2.2 Amostras de urina .....	73
4.2.2.1 Exames físico-químicos .....	73
4.2.2.2 Sedimentoscopia urinária .....	74
4.2.3 Amostras de sangue .....	74
4.2.3.1 Perfil bioquímico sérico .....	75

4.2.3.2 Hematologia .....	75
4.2.4 Análise estatística.....	76
4.3 RESULTADOS.....	76
4.4 DISCUSSÃO .....	83
4.5 CONCLUSÃO .....	90
4.6 REFERÊNCIAS .....	91
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>SUPLEMENTOS .....</b>	<b>117</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença crônica não infecciosa causada pelo consumo prolongado de pequenas quantidades de samambaia (*Pteridium* spp.), associada a formação de neoplasmas na vesícula urinária. No Brasil foi descrita em todos os estados da Região Sul e é uma doença prevalente no rebanho bovino na Região do Vale do Ribeira. A principal substância tóxica identificada em *Pteridium* spp. é o ptaquilosídeo (Pt), um glicosídeo norsesquiterpeno com capacidades mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas.

Clinicamente a doença se caracteriza por hematúria contínua ou intermitente, anemia, prostração e emagrecimento progressivo, podendo levar alguns animais ao óbito. Alterações clínico-patológicas são mais evidentes nos animais com macrohematúria, sendo discretas naqueles com microhematúria ou em períodos de remissão da doença. Nestes, o diagnóstico pelo exame físico é dificultado. Ao exame histopatológico evidencia-se alterações neoplásicas de origem epitelial e/ou mesenquimal, além de hiperplasia do epitélio e presença de células inflamatórias.

A dinâmica das proteínas de fase aguda (PFA) vem sendo estudada em várias doenças inflamatórias e infecciosas que acometem os animais, e as pesquisas são promissoras para diagnóstico e monitoração do estado sanitário de indivíduos e rebanhos.

Considerando as implicações econômicas para a pecuária bovina da ocorrência de HEB e a necessidade de maiores informações sobre a doença,

torna-se relevante a investigação clínico-laboratorial dos animais acometidos, bem como a pesquisa de biomarcadores para HEB.

O primeiro capítulo dessa dissertação é composto por uma revisão de literatura abrangendo as principais características das plantas do gênero *Pteridium* spp., sua toxicidade para seres humanos e ruminantes. A segunda parte da revisão discorre sobre principais parâmetros hematológicos avaliados nos bovinos e PFA na medicina veterinária, com ênfase na Hp na espécie bovina. O segundo capítulo é composto pelo estudo “Parâmetros bioquímicos séricos e proteínas de fase aguda em bovinos com hematúria enzoótica”, o qual compara os achados laboratoriais nos bovinos com a doença, com os achados em bovinos saudáveis.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e a concentração no soro da proteína de fase aguda Hp, em bovinos com hematúria enzoótica oriundos de propriedades da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil, e compará-los com os resultados obtidos da análise do soro de bovinos saudáveis.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Por meio da urinálise, separar os bovinos com HEB em dois grupos, aqueles com macrohematúria e aqueles com microhematúria;
- Avaliar o hemograma dos bovinos com HEB (macrohematúria e microhematúria);



- Determinar a concentração sérica de Hp e avaliar as concentrações desta proteína na resposta inflamatória em bovinos com HEB (macrohematúria e microhematúria) e em bovinos sadios;
- Determinar as atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), gama glutamiltransferase (GGT) e de outros parâmetros (proteína sérica total [PT], albumina, globulinas, ureia e creatinina) em bovinos com HEB (macrohematúria e microhematúria) e suas concentração em bovinos sadios.

### 2.3 HIPÓTESES

- Bovinos com HEB apresentarão alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos, especialmente na concentração de Hp, relacionados com a resposta inflamatória, que poderiam ser utilizados como ferramentas de auxílio no diagnóstico clínico e acompanhamento da doença.

### 3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE *Pteridium* spp.

A samambaia pertence à ordem Polypodiales e à família Dennstaedtiaceae. O gênero foi considerado monotípico (*Pteridium aquilinum*), compreendendo duas subespécies, *caudatum* e *aquilinum*, com diversas variedades (FENWICK, 1988). Sem consenso, alguns pesquisadores consideravam outras classificações taxonômicas (MCKENZIE, 1978; XU, 1992).

As inconsistências para a classificação são atribuídas à plasticidade fenotípica, a escassez de caracteres taxonômicos úteis e a existência no campo de intermediários morfológicos entre os morfotipos definíveis (THOMSON, 2004). Além disso, características morfofisiológicas e moleculares distinguem as samambaias encontradas no Hemisfério Norte (clado Laurasiano) e Hemisfério Sul (clado Australiano/Sul-americano) (DER *et al.*, 2009).

Baseados em estudos morfométricos, citológicos e moleculares, Thomson *et al.* (2008) propuseram uma nova classificação taxonômica para o gênero *Pteridium*, que passou a contemplar cinco espécies, divididas entre linhagens diploides e alotetraploides, resultado da hibridização das espécies diploides. A nova classificação taxonômica pode ser vista no quadro 1.

A samambaia é uma planta invasora cosmopolita, encontrada em quase todos os continentes (THOMSON, 2004; DER *et al.*, 2009), exceto em regiões desérticas frias e quentes (DER *et al.*, 2009). Nas Américas, o Chile é o único país onde a planta não ocorre, possivelmente pela barreira criada pela Cordilheira dos Andes, pelos desertos do Norte e pelos ventos do Leste do

Oceano Pacífico, que dificultam a dispersão dos esporos oriundos da Bolívia e Argentina (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001).

Quadro 1. Classificação taxonômica, linhagem e distribuição do gênero *Pteridium* spp. Adaptado de Der *et al.* (2009) e Thomson, Mickel e Mehltreter (2008).

Espécie (linhagem)	Subespécie	Distribuição
<b><i>P. aquilinum</i> (2n= 104)</b>	<i>latiusculum</i>	América do Norte
	<i>pinetorum</i>	Europa
	<i>japonicum</i>	Ásia
	<i>capense</i>	África subsaariana
	<i>aquilinum</i>	Europa
	<i>wightianum</i>	Índia, Sudeste da Ásia e Norte da Austrália
	<i>decompositum</i>	Ilhas do Havaí
	<i>centrali-africanum</i>	África subsaariana
	<i>pseudocaudatum</i>	Leste da América do Norte
	<i>pubescens</i>	América do Norte
	<i>feeii</i>	América Central
<b><i>P. esculentum</i> (2n= 104)</b>		Hemisfério Sul (Austrália)
<b><i>P. arachnoideum</i> (2n= 104)</b>		Hemisfério Sul (América do Sul - <b>Brasil</b> )
<b><i>P. caudatum</i> (4n= 208)</b>		Norte da América do Sul e América Central
<b><i>P. semihastatum</i> (4n= 208)</b>		Sudoeste da Ásia e Norte da Austrália
<b><i>P. esculentum</i> (2n= 104)</b>		Hemisfério Sul (Austrália)
<b><i>P. arachnoideum</i> (2n= 104)</b>		Hemisfério Sul (América do Sul)
<b><i>P. caudatum</i> (4n= 208)</b>		Norte da América do Sul e América Central

A planta se desenvolve principalmente em áreas abertas, encostas e infestando áreas de pastagem (FENWICK, 1988; XU, 1992). Todavia, adapta-se facilmente aos locais por apresentar grande plasticidade fenotípica em relação às variáveis ambientais (THOMSON, 2004). Evidências fósseis indicam uma dispersão mundial de *Pteridium* spp. durante o Oligoceno, há aproximadamente 23 milhões de anos. A planta compunha florestas abertas antes da propagação da agricultura, mas tornou-se mais prevalente com a intensificação da mesma (PAGE, 1976).

É uma das poucas pteridófitas que se tornaram problemáticas para o homem (PAGE, 1976), uma das cinco ervas daninhas mais perniciosas do

mundo e a única planta vascular naturalmente carcinogênica para animais. A invasão de áreas agricultáveis tem prejudicado o cultivo em vários países, como Ilhas Britânicas, parte da Europa Oriental, Nova Zelândia, Austrália, alguns países Asiáticos, América Central, Norte da América do Sul, Brasil e Argentina (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001).

As samambaias neotropicais, *P. caudatum* e *P. arachnoideum*, distribuem-se desde o nível do mar até elevadas altitudes (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001). Diferentemente das samambaias do Hemisfério Norte, que sofrem uma pausa no desenvolvimento durante os meses de inverno, apresentam crescimento contínuo de rizomas e frondes ao longo do ano, podendo chegar a 4 m de altura nas bordas das florestas. No entanto, sua dinâmica de crescimento é muito susceptível às variações dos fatores edafoclimáticos, sendo favorecida pelas altas temperaturas e inibida pelo sombreamento (ROOS *et al.*, 2010).

Segundo Silva Matos e Belinato (2010), em estudo conduzido no Estado do Rio de Janeiro, algumas espécies de árvores tropicais utilizadas para a recuperação de áreas degradadas sofrem efeito de inibição na germinação de sementes pelo lixiviado de *P. arachnoideum*. A samambaia é uma invasora comum na Floresta Atlântica, principalmente em regiões acometidas por queimadas e desmatamento. Além do comprovado efeito alelopático, a densa camada criada pelas frondes da samambaia impede que as sementes das árvores cheguem ao solo e aumentam o sombreamento da superfície do mesmo. O estudo ainda sugere que os projetos de reflorestamento considerem as respostas das espécies arbóreas escolhidas frente à *P. arachnoideum* nas regiões de ocorrência da samambaia.

O rizoma, um caule subterrâneo que armazena as reservas energéticas da samambaia, detém quase 80% da biomassa viva (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001), apresenta gemas dormentes e é o responsável pela rápida propagação, longevidade e crescimento da planta (DE SILVA; MATOS, 2006). Por se encontrar profundamente no solo, está protegido da geada e do fogo, garantindo a sobrevivência da samambaia em todas as épocas do ano e em incidentes ambientais (COQUILLAT, 1950; MADEJA *et al.*, 2009). Forma uma rede que se propaga paralelamente ao solo, e sua dinâmica de crescimento ocorre em função das condições locais (clima, solo e vegetação). Sua capacidade de penetração vertical e, por tanto, sua profundidade, não são definidas, mas sabe-se que são capazes de penetrar em argila calcária bastante densa (WATT, 1940). Estrutural e funcionalmente, consistem em um eixo principal (longo, mais profundo e de crescimento rápido) e em eixos laterais intermediários e curtos. Os mais curtos são os únicos capazes de originar as frondes, enquanto os demais constituem as reservas de carboidratos (WATT, 1940; LE DUC; PAKEMAN; MARRS, 2003). Os rizomas curtos podem se transformar em longos ou intermediários, alterando a alocação entre os dois sistemas convenientemente (WATT, 1940).

As samambaias se reproduzem principalmente pela forma vegetativa (propagação dos rizomas) (MADEJA *et al.*, 2009). No entanto, os esporos de *Pteridium* spp. tem a capacidade de se dispersar por longas distâncias, e se estabelecem com facilidade em áreas onde as queimadas eliminaram demais competidores (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001; DE SILVA; MATOS, 2006).

Roos *et al.* (2010), em seu experimento realizado no Sul do Equador, onde a samambaia é a planta invasora mais agressiva, compararam áreas nativas da planta, algumas submetidas à queimadas e outras não. Nas áreas de

queimadas, as samambaias que rebrotaram apresentaram, em média, um mês a mais de vida, fato explicado pela maior quantidade de nutrientes provenientes das cinzas, rapidamente alocados após incêndios em climas úmidos. Em áreas não perturbadas, a falta de nutrientes limitou o crescimento das frondes.

Em estudo de comparação de métodos de controle de samambaias no Reino Unido, o corte das frondes feitos duas vezes por ano se mostrou eficaz. Porém, quanto maior for a atividade produtiva da planta, maior é sua capacidade de resiliência frente a qualquer tratamento. Nesses casos, o corte realizado no primeiro ano do experimento e a pulverização do herbicida Azulam [metil (4-aminobenzenosulfonil) carbamato] no ano subsequente obtiveram os melhores resultados (LE DUC; PAKEMAN; MARRS, 2003). Adicionalmente, a restauração da vegetação pareceu ajudar no controle da samambaia, uma vez que promove a inibição da sucessão (SNOW; MARRS, 1997; LE DUC; PAKEMAN; MARRS, 2003).

Como as bibliografias consultadas não utilizam a mesma nomenclatura e/ou foram escritas antes da classificação taxonômica proposta por Der *et al.* (2009) e Thomson, Mickel e Mehlreter (2008), esta revisão prosseguirá utilizando apenas *Pteridium* spp. para se referir a todas as espécies e variedades de samambaia, com exceções oportunas.

### 3.2 PRINCÍPIOS ATIVOS TÓXICOS DE *Pteridium* spp.

O sucesso ecológico de *Pteridium* spp. é inquestionável, sendo atribuído principalmente a sua facilidade de adaptação às variáveis ambientais (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001; THOMSON; MICKEL; MEHLRETER, 2008) e a ausência animais e insetos que a coloque em risco pelo consumo. A planta contém

compostos tóxicos para muitos vertebrados domésticos, além de substâncias químicas que repelem os insetos (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001).

As síndromes tóxicas agudas e crônicas provocadas pela ingestão de samambaia são há muito conhecidas, sabendo-se que variam de acordo com cada espécie animal, assim como as quantidades e o tempo de ingestão da planta necessários para causá-las (EVANS, 1976; XU, 1992; SHAHIN *et al.*, 1998a). Essas intoxicações foram descritas antes mesmo dos princípios ativos tóxicos serem identificados (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967, 1969; EVANS, 1968, 1976; HIRONO *et al.*, 1970;). No entanto, vários pesquisadores se dedicaram a identificação e isolamento dessas substâncias, as quais são descritas abaixo.

### 3.2.1 Ácidos fenólicos e taninos

Flavonoides, taninos e ácidos fenólicos de baixo peso molecular se acumulam nas frondes de samambaia conforme seu crescimento, protegendo a planta contra os herbívoros (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001).

Segundo Wang *et al.* (1976), a administração intravesical e intravenosa de taninos isolados a partir de samambaia foi capaz de induzir tumores na vesícula urinária de camundongos. No entanto, a inclusão desses componentes na dieta de camundongos não induziu a formação de neoplasmas na vesícula urinária e no intestino. Ainda, repetidas aplicações do composto no tecido subcutâneo levou ao aparecimento de neoplasia em alguns animais nos respectivos locais de aplicação (PAMUKCU *et al.*, 1980).

A quercitina, um flavonoide encontrado em *Pteridium*, é mutagênica tanto para células procariontes, quanto para células eucariontes, uma vez que induz

alterações cromossômicas (PAMUKCU *et al.*, 1980; CAMPO, 1997), tendo mostrado atividade mutagênica pelo teste de Ames com *Salmonella typhimurium* TA 98 e TA 100 (PAMUKCU *et al.*, 1980). Adicionalmente, a substância é capaz de interferir na transdução de sinal por ativar ou inibir proteínas quinases e fosfatases (CAMPO, 1997). Segundo Pamukcu *et al.* (1980), a quercitina foi capaz de induzir neoplasias na vesícula urinária e intestinais em ratos. Por outro lado, nenhum outro grupo de pesquisadores conseguiu confirmar esse potencial (MORI *et al.*, 1985; FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002).

### 3.2.2 Tiaminases

A observação de algumas alterações sugestivas de deficiência de vitamina B1 (tiamina) em ratos alimentados com samambaia levou alguns pesquisadores a indagar sobre a presença de substâncias anti-tiâmicas em *Pteridium* spp., uma vez que os sinais clínicos observados eram os mesmos apresentados por cavalos que consumiam a planta. Mesmo sem determinar o modo de ação da substância, provou-se que não apresentava diminuição de toxicidade pela dessecação, era insolúvel em éter etílico e acetona, e ligeiramente solúvel em álcool etílico 92% (WESWIG; FREED; HAAG, 1946). Mais tarde, Thomas e Walker (1949) identificaram menores concentrações de tiamina em coração e fígado de ratos alimentados com samambaia e não suplementados com tiamina, quando comparados ao grupo controle. Adicionalmente, comprovaram *in vitro* a inativação de tiamina pela samambaia.

Diferentemente dos ruminantes, os quais são capazes de sintetizar vitamina B1 (tiamina), assim como todas as vitaminas do complexo B, pela ação da microbiota ruminal, os monogástricos dependem exclusivamente da dieta para a manutenção de níveis adequados dessa vitamina. Em deficiências da



mesma, os animais apresentam emaciação, anorexia e polineurites (WESWIG; FREED; HAAG, 1946; THOMAS; WALKER, 1949).

### 3.2.3 Compostos cianogênicos

Apenas um glicosídeo cianogênico foi identificado em *Pteridium* spp., a prunasina (FENWICK, 1988; SHAHIN; SMITH; PRAKASH, 1999). No entanto, está relacionada a danos apenas de alguns insetos. A presença conjunta de glicosídeos iludanos, como o Pt, conferem alguma proteção a planta frente aos predadores, seja insetos, seja mamíferos (ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001).

### 3.2.4 Compostos iludanos

A separação e teste de carcinogenicidade para cada fração de *Pteridium* spp. foram cruciais para o isolamento do principal composto tóxico da samambaia, o ptaquilosídeo, em 1983 por Niwa *et al.* (1983).

O Pt caracteriza-se por ser um glicosídeo norsesquiterpeno do tipo iludano (NIWA *et al.*, 1983; HIRONO *et al.*, 1984a). É um composto amorfo, incolor, prontamente solúvel em água. É estável em atmosfera seca, porém se decompõe em soluções aquosas sob temperatura ambiente, em taxa dependente do pH da solução, sendo a meia-vida de 40 minutos em pH 9,0 (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

Em pH baixos o Pt sofre gradual aromatização pela liberação de D-glicose, transformando-se em pterosina B. Já em pH fracamente alcalino o Pt é transformado rapidamente em uma dienona conjugada (Pt ativado – Pta). A dienona é instável sob condições fracamente ácidas, sendo convertida rapidamente em pterosina B. Essa substância se mantém estável em soluções

alcalinas por no mínimo uma hora (NIWA *et al.*, 1983; SHAHIN *et al.*, 1998a; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007) (Figura 1).

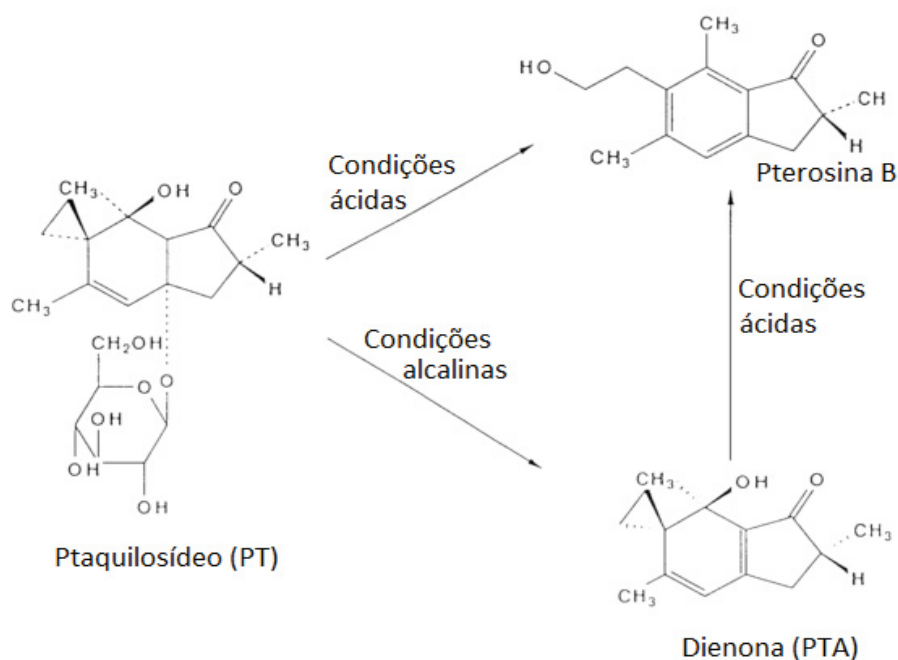


Figura 1. Estrutura química do ptaquilosídeo e alterações da molécula conforme o pH do meio. Fonte: Adaptado de Shahin *et al.* (1998).

A estrutura química do Pt permite que a substância atravesse barreiras lipídicas e, também, seja dissolvida em água, facilitando o acesso do mesmo ao núcleo celular e ao próprio DNA (ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2002). A dienona é um potente agente alquilante, ligando-se covalentemente as bases purinas, adenina e guanina, promovendo a ruptura do DNA (OJIKI *et al.*, 1987, 1989; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

Efeitos carcinogênicos, clastogênicos e mutagênicos foram comprovados no Pt, sendo a samambaia a única planta capaz de induzir naturalmente a carcinogênese (MATSUOKA *et al.*, 1989; NAGAO *et al.*, 1989; SAITO *et al.*, 1989; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

Estudo realizado por Alonso-Amelot *et al.* (1995) comparou duas variedades de *P. aquilinum*, var. *caudatum* e *arachnoideum* (mais tarde elevadas a espécies), quanto à concentração de princípios tóxicos, constatando que pastos infestados pela var. *caudatum* são consideravelmente mais tóxicos aos animais, uma vez que a variedade apresenta maior concentração de Pt. Hirono e Shibuya (1970), demonstraram que a capacidade cancerígena é maior em plantas jovens, fase do desenvolvimento da samambaia mais palatável para os herbívoros (ALONSO-AMELOT; RODULFO-BAECHLER; JAIMES-ESPINOZA, 1995). No entanto, mudanças radicais ocorrem na concentração de metabólitos durante as fases de vida da samambaia, sendo que todas as partes da planta contêm o princípio tóxico (HIRONO *et al.*, 1970).

Saito *et al.* (1990), isolaram o Pt também em outros gêneros da família Pteridaceae oriundas do Japão, as samambaias *Pteriscretica* e *Histiopteris incisa*. Além disso, identificaram três glicosídeos análogos ao Pt, os hipolosídeos A, B e C, a partir de *Hypolepispuncata* e *Dennstaedtia hirsta*, sugerindo que estes constituintes ocorram amplamente em todas as pteridáceas.

Os agentes carcinogênicos são classificados em duas classes, aqueles que agem diretamente com as proteínas do DNA, sem requerer ativação enzimática prévia, e aqueles que após ativação metabólica geram compostos reativos, chamados de últimos carcinógenos. Dessa forma, o Pt é considerado um agente carcinogênico de ação direta, uma vez que a dienona, último carcinógeno, é formada sem a necessidade de ação enzimática (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). A pterosina B, por sua vez, é considerada a forma final do Pt (OJIKI *et al.*, 1989).

O primeiro relato sobre a modificação e clivagem de DNA *in vitro* pela dienona foi publicado por Ojika *et al.* (1989), os quais utilizaram DNA de esperma de salmão e provaram que a alquilação de adeninas promove a ruptura do DNA. Sabe-se que o dano causado no material genético pela alquilação é associado ao desencadeamento de carcinogênese (OJIKA *et al.*, 1989; PRAKASH *et al.*, 1996).

A carcinogênese *in vivo* foi demonstrada inicialmente por Hirono *et al.* (1984b), os quais induziram em ratos a formação de neoplasias na glândula mamária e no íleo em, respectivamente, 100% e 91% no grupo 1 e 57% e 91%, no grupo 2 de animais testados. Matoba *et al.* (1987), testaram a modificação do teste de Ames com a pré-incubação em pH 8,5 do Pt com estirpes de *S. typhimurium* TA 98 e TA 100, demonstrando o efeito mutagênico em ambas cepas.

Shahin *et al.* (1998b), ao induzir intoxicações por Pta em ratos (aguda, com administração da toxina por via intragástrica [IG]) e crônica (administração IG e intravenosa [IV]) demonstrou que alguns animais cronicamente intoxicados por via IV, desenvolveram adenocarcinoma na glândula mamária e, quando submetidos a eutanásia logo após a última aplicação de Pta, apresentaram mutação no gene H-ras (códon 58 e 59) do tecido neoplásico. No entanto, tal mutação não alterou a proteína a ser codificada, mas demonstrou que a mutação em H-ras é um evento precoce na carcinogênese do Pta.

As observações clínicas nos bovinos corroboram com a necessidade de meio alcalino para a ativação de Pt em dienona, uma vez que a samambaia induz, em bovinos, neoplasias nas vias digestivas superiores e vesícula urinária, ambientes onde o pH varia, respectivamente, entre 8,1 e 8,2 (saliva) e 7,5 a 8,5

(urina) (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). Essa característica torna a carcinogenicidade do Pt órgão-específica (PRAKASH *et al.*, 1996). Ainda, em experimento *in vitro*, a concentração de Pt capaz de induzir aberrações cromossômicas foi 90 vezes maior em pH 5,3, do que em pH 7,4 e 8,0 (MATSUOKA *et al.*, 1989).

Em bezerros, a intoxicação experimental pela ingestão de samambaia por 28 dias, provocou várias alterações nas serosas de duodeno e íleo. Ainda, a pesquisa de alterações no gene H-ras em amostras do íleo foi positiva para mutação por alquilação de adenina no códon 61, seguido por despurinação (PRAKASH *et al.*, 1996).

Em ovinos e em alguns bovinos, a doença chamada de “bright blindness” foi também atribuída a intoxicação por *Pteridium* spp., ainda na década de 1960. A doença se caracteriza pela progressiva degeneração da retina e do neuroepitélio retinal e estenose dos vasos sanguíneos. Apenas dez anos depois da identificação e isolamento do Pt (NIWA *et al.*, 1983) que Hirono *et al.* (1993) reproduziram experimentalmente a doença e comprovaram que o Pt era a fração de *Pteridium* spp. que a provocava.

### 3.3 EFEITOS TÓXICOS DO PTAQUILOSÍDEO NOS SERES HUMANOS

Apesar de os efeitos tóxicos serem há muito tempo conhecidos, a samambaia foi utilizada como cama de animais. Ainda hoje é usada como fonte de alimento para seres humanos em quase todos os lugares de sua distribuição (MADEJA *et al.*, 2009), principalmente no Brasil e Japão (HIRONO *et al.*, 1970; SHAHIN; SMITH; PRAKASH, 1999; RECOUSO *et al.*, 2003). É também associada ao desenvolvimento de neoplasias no trato digestório superior na

espécie (ALONSO-AMELOT *et al.*, 1998; MARLIÉRE *et al.*, 1998; ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2002).

Segundo Madeja *et al.* (2009), o primeiro relato do uso de rizoma de samambaia como fonte de alimentos para seres humanos, utilizado na preparação de pães, está contido no livro *Brut Chronicles*, escrito por William Caxton em 1480. Mais tarde, durante escassez alimentar decorrente do rigoroso inverno francês de 1816 a 1817, há indícios do uso do rizoma de samambaia, seco e triturado, misturado ao centeio e outras farinhas, para a fabricação de pães pela população pobre (COQUILLAT, 1950).

No Japão, os brotos de samambaia, chamados de “Warabi”, fazem parte da culinária, sendo consumidos frescos ou enlatados (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). Para o preparo dos brotos, os mesmos passam por um tratamento térmico de fervura durante cinco a dez minutos para “quebra da dureza”. Por vezes, adiciona-se cinza de madeira e bicarbonato de sódio à água de fervura. Esse procedimento, apesar de diminuir o potencial carcinogênico de *Pteridium* spp., não o anula (HIRONO *et al.*, 1970).

No Brasil, na cidade de Ouro Preto, no Estado de Minas Gerais, e em cidades vizinhas, brotos e frondes jovens de samambaia são comumente consumidos refogados ou em guisados com carne, sendo vendidos em feiras (MARLIÉRE *et al.*, 1998; RECOUSO *et al.*, 2003). Nesta região, a qual apresenta maior incidência de neoplasias do trato digestório superior em seres humanos, quando comparada a outras regiões onde a ingestão de samambaia não ocorre, foi realizado um estudo epidemiológico retrospectivo, onde identificou-se 46 casos positivos para neoplasia em trato digestório superior por endoscopia. Destes, os pacientes que ingeriram broto de samambaia apresentaram um

aumento de 5,47 vezes na “razão de chances” para o desenvolvimento destas neoplasias (MARLIÉRE *et al.*, 1998).

Em estudo de Recouso *et al.* (2003), com 23 indivíduos selecionados na Região de Ouro Preto, MG, foram divididos entre aqueles que consumiam samambaia por mais de oito anos e aqueles que não a consumiam. Os linfócitos pesquisados no sangue periférico de indivíduos dos dois grupos apresentaram alterações cromossômicas, as quais foram significativamente maiores no grupo que consumia *Pteridium* spp.

Alonso-Amelot, Castillo e De Jongh (1993) comprovaram a excreção de Pt no leite de vacas alimentadas com *Pteridium* spp., sendo a excreção dose-dependente, situação preocupante para saúde pública (ALONSO-AMELOT *et al.*, 1998). Recentemente, um novo método foi validado para a determinação da concentração de Pt e Pterosina B em plasma, urina e leite bovino, que poderá contribuir com estudos futuros (ARANHA *et al.*, 2014).

Na Venezuela, duas regiões distintas foram analisadas quanto a incidência e localização de tumores, assim como as condições sociais e hábitos alimentares de seus moradores. Nas regiões próximas do Lago Maracaibo e com rara presença de samambaia, as neoplasias gástricas correspondiam ao quinto principal tipo de tumores. Já nas regiões montanhosas repletas de samambaia, representavam mais de 30% das mortes relacionadas a câncer. Como a ingestão de samambaia não é comum no país, a ingestão de Pt ocorre indiretamente pelo consumo de leite contaminado. As regiões montanhosas analisadas no estudo caracterizavam-se pela criação extensiva de bovinos leiteiros, que nas épocas

de escassez de pasto, consumiam samambaia (ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2001).

Schmidt *et al.* (2005) comprovaram a ocorrência de lixiviação do Pt a partir dos rizomas para o solo, principalmente quando o pH do mesmo é ligeiramente ácido a neutro, tem um alto teor de argila e quando a degradação microbiana do Pt é lenta. Neste contexto, as contaminações do lençol freático e cursos d'água em áreas de ocorrência de samambaia são preocupantes.

### 3.4 DOENÇAS CAUSADAS PELOS PRINCÍPIOS RADIOMIMÉTICOS DE *Pteridium* spp. NOS BOVINOS

Bovinos desenvolvem duas formas de expressão clínica da intoxicação por samambaia, uma aguda e outra crônica. A intoxicação aguda é marcada pela aplasia de medula óssea e síndrome hemorrágica aguda (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967; TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; FENWICK, 1988; SOUZA; GRAÇA, 1993). Já a intoxicação crônica ocorre na forma de neoplasias na vesícula urinária e no trato digestório superior (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; FENWICK, 1988; SOUZA; GRAÇA, 1993).

#### 3.4.1 Síndrome hemorrágica aguda

É também chamada de diátese hemorrágica e acomete bovinos jovens e adultos. A intoxicação ocorre de forma superaguda, aguda ou subaguda, após a ingestão de quantidades de samambaia superiores a 10g kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, por mais de três meses (SOUZA; GRAÇA, 1993; MARÇAL *et al.*, 2002; TOKARNIA *et al.*, 2012) e após oito meses da última ingestão (TOKARNIA *et al.*, 2012).



De modo geral, a ingestão da planta pelos bovinos está associada à escassez de alimento, falta de alimentos fibrosos e superlotação de pastagens (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; TOKARNIA *et al.*, 2012). Em regiões onde as queimadas ainda são utilizadas como manejo de pastos, ocorre um rápido alastramento de *Pteridium* spp. pela rebrota e proliferação de rizomas (FURLAN *et al.*, 2014), causando o crescimento paralelo às gramíneas e favorecendo o consumo involuntário dos animais (MCKENZIE, 1978). No entanto, bovinos podem desenvolver vício pelo consumo da planta (TOKARNIA *et al.*, 2012).

Os sinais clínicos apresentados pelos animais intoxicados são febre alta, anorexia, pelos sem brilho, petéquias e hemorragias em mucosas e lesões de pele, inclusive nas picaduras por carrapato, diarreia com presença de coágulos sanguíneos, hemorragias espontâneas e dispneia, com evolução de três a sete dias, culminando no óbito (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967; MARÇAL *et al.*, 2002; TOKARNIA *et al.*, 2012).

À necropsia, hemorragias são encontradas em todos os órgãos e úlceras nas mucosas. Exames histopatológicos da medula óssea demonstram a aplasia, que leva a trombocitopenia e leucopenia, sem afetar a produção de eritrócitos (ANJOS *et al.*, 2008). Há relatos de sobrevivência de alguns animais, assim como o de tratamento com sucessos em alguns casos. Consiste em antibioticoterapia para a prevenção de infecções bacterianas secundárias e transfusões sanguíneas (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967; MARÇAL *et al.*, 2002; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Tokarnia, Döbereiner e Canella (1967) relataram casos de diátese hemorrágica causando mortandades em vários animais oriundos de fazendas

dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A doença ocorria com certa frequência, geralmente nos meses de inverno, quando o gado bovino era transferido para pastagens infestadas por *Pteridium* spp. Acometia principalmente bovinos de até dois anos de idade, alguns adultos e bezerros.

Em 1987 um surto de intoxicação aguda foi descrito em ovinos na Austrália em um período de seca. O rebanho de 450 Merinos pastejava em áreas infestadas de samambaia, cujo controle fora tentado meses antes com calagem do solo, e apenas frondes jovens estavam presentes. Os sinais clínicos de anorexia, depressão, anemia e diarreia começaram um mês após a entrada dos animais na área, e em pouco tempo 120 ovinos foram a óbito. Os animais necropsiados apresentaram petéquias e hemorragias na carcaça e vísceras, e a medula óssea apresentava degeneração seletiva de células mieloides. Apesar de a mesma síndrome dos bovinos acometer também os ovinos, os pesquisadores relatam que a espécie é naturalmente mais resistente a intoxicação, além de mais seletivos na escolha dos alimentos (SUNDERMAN, 1987).

Em estudo retrospectivo, foram avaliados 6256 laudos de necropsias de bovinos realizados entre 1964 e 2006 pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, LPV/UFSM. Foram encontrados 37 casos de intoxicação aguda por *Pteridium* spp., oriundos de dez propriedades da Região Central do Rio Grande do Sul, seis casos individuais e os demais em forma de surto. Nessas propriedades havia a contaminação dos pastos pela planta (ANJOS *et al.*, 2008)

No Paraná, em 2002, um surto de intoxicação aguda por samambaia foi descrito em uma propriedade com infestação da planta nos piquetes e

superlotação da pastagem. Nesse episódio, 14 animais vieram a óbito, desde vacas adultas, até bezerros de quatro e cinco meses de idade (MARÇAL *et al.*, 2002).

#### 3.4.2 Hematúria enzoótica dos bovinos e carcinoma das vias digestivas superiores

Nos bovinos, a intoxicação crônica por *Pteridium* spp. ocorre na forma de neoplasias na vesícula urinária e no trato digestório superior (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; FENWICK, 1988; SOUZA; GRAÇA, 1993).

A HEB é associada a formação de neoplasmas na vesícula urinária (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; MCKENZIE, 1978; XU, 1992). Apesar da ocorrência comum em bovinos em lugares onde a doença é endêmica, demais causas de neoplasias primárias no órgão são desconhecidas nos bovinos (PAMUKCU; GÖKSOY; PRICE, 1967; MEUTEN, 2016).

É uma doença de evolução lenta, desencadeada pela ingestão de pequenas quantidades de samambaia, menos de 10g kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, por mais de um ano, e por esse motivo, costuma ocorrer em animais adultos, nos dois sexos, a partir dos dois anos (TOKARNIA *et al.*, 2012). Sua ocorrência é tão ampla quanto a distribuição da samambaia pelos continentes. No entanto, as espécies de *Pteridium* spp. possuem diferentes concentrações de Pt e, conseqüentemente, diferentes capacidades carcinogênicas (TOKARNIA *et al.*, 2012). Nessas áreas a incidência da doença é variável, sendo ocasional em alguns casos, ou acometendo mais de 90% dos animais expostos (PAMUKCU, 1963).

Como já descrito anteriormente, o Pt presente na samambaia tem como órgão alvo a vesícula urinária, uma vez que o pH da urina dos ruminantes é

alcalino, o que permite sua conversão para molécula ativa (NIWA *et al.*, 1983; OJIKI *et al.*, 1987; SAITO *et al.*, 1989, 1990; SHAHIN *et al.*, 1998a; ALONSO-AMELOT *et al.*, 2001; ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2002; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). É uma doença primariamente de bovinos, tendo sido descrita também em búfalos d'água na Turquia e em ovinos (PAMUKCU, 1963).

O quadro clínico denomina a doença, a qual se inicia sem sinais sistêmicos, apenas macrohematúria intermitente ou persistente, de começo lento e caráter progressivo, com duração de semanas a meses. A presença de coágulos na urina ocorre em alguns animais (PAMUKCU; PRICE; BRYAN, 1976; MCKENZIE, 1978) e o exercício muscular parece aumentar a hemorragia. Ascite e edema submandibular já foram descritos em bovinos com a doença, além de cistite crônica (MCKENZIE, 1978). Geralmente os animais enfermos apresentam-se anêmicos, prostrados e têm emagrecimento progressivo, ocorrendo o óbito em alguns casos (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002).

Alterações clínico-laboratoriais em bovinos naturalmente intoxicados por samambaia foram estudadas por Falbo *et al.* (2005), que evidenciaram a característica intermitente da doença e a ausência de alterações significativas no eritrograma e leucograma nos animais sem hematúria clínica. No entanto, a hipocalcemia, hipercalcúria e aumento da excreção urinária de fósforo foram achados tanto nos animais com microhematúria, quanto nos com macrohematúria.

Macroscopicamente as lesões da vesícula urinária são bem variadas, desde pequenos nódulos, formações com aspecto de couve-flor de vários tamanhos e colorações (esbranquiçadas, amareladas, avermelhadas), espessamento difuso da parede e lesões que parecem coalescer. São comuns

casos de cistite associados (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; SMITH; BEATSON, 1970; TOKARNIA *et al.*, 2012) .

Microscopicamente, vários tipos de neoplasias são encontrados, tanto epiteliais, quanto mesenquimais, geralmente associados. Estes podem ser hemangiomas, carcinomas (PRICE; PAMUKCU, 1968; MCKENZIE, 1978; FALBO *et al.*, 2005), hemangiossarcomas (MCKENZIE, 1978; SOUZA; GRAÇA, 1993; FURLAN *et al.*, 2014) e adenocarcinomas (PRICE; PAMUKCU, 1968; TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969). Além disso, é comum o achado de hiperplasia e metaplasia da mucosa do órgão (FALBO *et al.*, 2005).

No estudo de Pamukcu *et al.* (1976), comparando a ocorrência natural e induzida de tumores na vesícula urinária por intoxicação por samambaia em vacas, aproximadamente 35% dos tumores eram de origem epitelial (adenomas, carcinomas, adenocarcinomas), 55% eram mistos (epiteliais e mesenquimais), e 10% eram apenas mesenquimais (hemangiomas, fibromas, fibrossarcomas). Além disso, as neoplasias de animais naturalmente e experimentalmente intoxicados por Pt não apresentaram diferenças macroscópicas e microscópicas.

Hadwen (1918) descreveu uma doença que acometia os bovinos geralmente no final do inverno, com manifestação clínica inicial apenas de hematúria. Conforme a lenta progressão, os animais apresentavam emaciação, apetite depravado, edema, diarreia e anemia. O óbito ocorria por caquexia, não antes de um ano do início dos sinais clínicos. A doença acometia tanto machos quanto fêmeas, mas os machos morriam antes pela obstrução uretral por coágulos, expelidos facilmente pelas fêmeas. Em alguns animais a doença tinha um curso rápido, com tendência à hemofilia, casos que provavelmente se tratavam de diátese hemorrágica. Relacionou a doença com animais criados em

terras agrícolas pobres, negligenciadas, classificando a doença como a da terra de fazendeiros pobres.

Pamukcu (1957), mesmo já tendo estudado a hematúria enzoótica em bovinos e bubalinos na Turquia, e conhecendo a distribuição a doença, aspectos clínicos e histopatológicos, permanecia sem conhecer sua etiologia. Descreveu detalhadamente as lesões de 285 vesículas urinárias obtidas de bovinos e búfalos em abatedouros da região. Destas, 15% apresentaram lesões neoplásicas nas regiões ventral e lateral do órgão, locais onde a urina fica em constante contato. Logo, intuiu que o agente neoplásico deveria estar na urina e precisava de contato com a parede vesical para desencadear as lesões.

Dez anos depois, após alguns pesquisadores já terem conseguido reproduzir a HEB experimentalmente com *Pteridium* spp., Pamukcu, Göksoy e Price (1967) também reproduziram a doença. Dez das dezoito vacas alimentadas com samambaia apresentaram neoplasias variadas na vesícula urinária. Desde então, vários casos de HEB vem sendo descritos em vários países (XU, 1992; ÖZKUL; AYDIN, 1996; ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2001; FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; SÁNCHEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2004).

Em 2006 foi realizado um estudo em uma região de Portugal onde *Pteridium* spp. cresce em abundância e HEB é comum. Foram coletadas 433 vesículas urinárias em abatedouro da região, 373 apresentavam neoplasias, 55 tinham apenas lesões inflamatórias e/ou anormalidades epiteliais não-neoplásicas. Sabe-se que lesões não-neoplásicas podem tanto regredir, quanto progredir, dependendo do estímulo oferecido. Evidências sugerem que o

desenvolvimento do tumores na BEH seja um processo contínuo, com atipia, displasia e carcinoma *in situ*, que correspondem a diferentes fases sucessivas do mesmo processo (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006).

O diagnóstico da HEB geralmente é feito pelo exame clínico e pela epidemiologia (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; MARÇAL, 2003). Segundo Marçal (2003), em propriedades com marcada infestação dos pastos por *Pteridium* spp., o diagnóstico precoce de HEB pode ser realizado pela análise laboratorial da urina de alguns animais para determinar a presença de microematuria, o que permite a translocação dos animais para áreas sem a planta tóxica. No entanto, a sobrevivência de bovinos com HEB realocados em áreas sem samambaia, não foi superior a dois anos (GALVÃO *et al.*, 2012). Como não há tratamento efetivo para HEB, apenas medidas paliativas são tomadas para os animais intoxicados. A profilaxia das pastagens constitui a forma mais eficaz para o controle da doença, principalmente por meio do bom manejo do solo (MARÇAL, 2003) e a continuidade desse cuidado, uma vez que o descuido com áreas anteriormente controladas leva a uma reinfestação mais agressiva da samambaia (FURLAN *et al.*, 2014).

No Brasil, a ocorrência de HEB foi descrita no Espírito Santo (SILVA *et al.*, 2009), Mato Grosso (FURLAN *et al.*, 2014), Rio de Janeiro (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969), Rio Grande do Sul (SOUZA; GRAÇA, 1993), Santa Catarina (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1969; SOUZA; GRAÇA, 1993; MOREIRA SOUTO *et al.*, 2006) e Paraná (CURIAL, 1964; FALBO *et al.*, 2005).

As primeiras informações no país sobre a ocorrência de HEB e a correlação da sua causa com a ingestão crônica de *Pteridium* spp. foram

fornechas por Curial (1964), que relatou a ocorrência em um rebanho bovino da raça Nelore, em Paranavaí, Paraná. Desde 1953, o rebanho fora acometido por uma doença caracterizada por hematúria, emaciação e tinha caráter enzoótico. Além da constatação da contaminação por samambaia nos piquetes onde os bovinos pastavam, nove animais foram necropsiados e as vesículas urinárias avaliadas. Em todas as vesículas foram encontradas neoplasias, algumas benignas (papilomas, adenomas e hemangiomas) e outras malignas (carcinoma espinocelular, carcinoma de células de transição e adenocarcinomas). Papilomas e carcinomas espinocelulares, além de lesões pré-neoplásicas, foram encontrados no trato digestório superior de alguns animais.

Mais tarde, Döbereiner, Tokarnia e Canella (1967) relataram vários históricos de HEB e neoplasias do trato digestório superior em bovinos oriundos dos Estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Caracterizaram como três doenças distintas: a HEB; uma doença caracterizada por “ronqueira” e disfagia, popularmente chamada de “figueira na goela” ou “caraguatá”; e uma doença caracterizada por regurgitação e timpanismo crônico. Essas duas últimas pareciam ocorrer em animais com mais de cinco anos de idade, na mesma região da HEB, sugerindo semelhante etiologia. Mais tarde, as duas manifestações passaram a compor única doença, chamada de carcinoma das vias digestivas superiores (CVDS), causada pelo desenvolvimento de carcinoma de células escamosas na base da língua, faringe, esôfago e rúmen dos bovinos (MOREIRA SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

No Rio Grande do Sul, de 30 bovinos estudados com neoplasias no trato digestório superior associados a intoxicação crônica por samambaia, foram



encontrados papilomas, papilomas em transição para células escamosas, e carcinoma de células escamosas. Adicionalmente, foram identificadas metástases desses carcinomas para linfonodos regionais e órgãos como fígado e pulmões em mais da metade dos casos. A hipótese do envolvimento do papilomavírus bovino tipo 4 com o desenvolvimento de CDVS pela intoxicação por Pt já foi levantada por vários outros pesquisadores, no entanto, a presença de áreas com alterações pré-neoplásicas e sem a presença de papilomas foi encontrada nesse estudo (MOREIRA SOUTO *et al.*, 2006).

### 3.5 PRINCIPAIS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS NOS BOVINOS

O exame físico é crucial para a avaliação do estado geral dos animais. Porém, apresenta limitações, principalmente em relação ao diagnóstico de doenças ocultas ou em fases iniciais. Os exames hematológicos oferecem subsídio não só para a análise individual, como em amostras de rebanhos, para avaliação clínica e do manejo dos animais (WEISS; PERMAN, 1992; FAGLIARI *et al.*, 1998; JONES; ALLISON, 2007). Valores de referência para parâmetros laboratoriais foram há muito estabelecidos para a espécie bovina, sendo consagrados pelos principais livros e pesquisadores (GEORGE; SNIPES; LANE, 2010; WEISS; WARDROP, 2010). No entanto, vários estudos demonstraram a alteração dessas variáveis de acordo com fatores raciais, etários, de gênero, de manejo e de dieta, ressaltando a importância da escolha dos valores de referência para o estabelecimento de comparações (AYRES *et al.*, 2001; BIRGEL JUNIOR *et al.*, 2001; GREGORY *et al.*, 2004; GEORGE; SNIPES; LANE, 2010).

### 3.5.1 Hemograma

A avaliação das células do sangue é feita pela análise do hemograma. O eritrograma avalia o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, o volume globular ou hematócrito, e os índices hematimétricos (volume corpuscular médio – VCM; hemoglobina corpuscular média – HCM; concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM) (WEISS; WARDROP, 2010).

O leucograma compreende a avaliação do número total de leucócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (linfócitos e monócitos), contagem diferencial e análise morfológica das células. Diferentemente das outras espécies, os bovinos têm uma menor reserva de granulócitos na medula óssea, que leva a uma rápida neutropenia após alterações inflamatórias supurativas (WEISS; WARDROP, 2010). Outra particularidade dos bovinos adultos, é a maior concentração de linfócitos em relação ao número de neutrófilos, descrita primariamente por Schalm (1962), onde a inversão dessas concentrações indica com precocidade a presença de desordens inflamatórias. Bovinos apresentam maior quantidade de eosinófilos quando comparado a outras espécies, no entanto, a ocorrência de eosinofilia é rara, geralmente relacionada à migração larvar e o desenvolvimento de doenças imunomediadas. As concentrações de basófilos no sangue dos bovinos são baixas. O número de monócitos circulantes é variável, não sendo considerado bom marcador de alterações (JONES; ALLISON, 2007).

Alterações fisiológicas também podem promover alterações no leucograma. No estresse agudo, pela liberação de adrenalina e consequente contração esplênica, há a liberação na circulação de leucócitos, levando a

leucocitose transitória sem alteração da relação neutrófilo/linfócito (N:L). Já no estresse crônico, por ação do cortisol, há o estímulo da medula óssea para a liberação de neutrófilos para a circulação e diminuição da migração para os tecidos, além da promoção linfopenia por meio do estímulo de linfólise e diminuição da recirculação dos linfócitos (JAIN, 1993). Nos bovinos, essas alterações são comumente vistas em bezerros após o desmame e imediatamente após o transporte, podendo ocorrer em adultos (PAES *et al.*, 2012).

### 3.5.2 Parâmetros bioquímicos séricos

Considerando os vários fatores que interferem a resposta leucocitária dos bovinos, a análise das proteínas do plasma contribui para uma avaliação mais fidedigna a real condição do organismo (WEISS; WARDROP, 2010).

São várias as proteínas que circulam no soro, compondo as proteínas séricas totais (PT). Essas são classificadas em frações, separadas por meio de eletroforese, em albumina e globulinas. A albumina é a proteína mais abundantes do plasma, tem alto peso molecular e sua principal função é a manutenção da pressão coloidosmótica e transporte de substâncias (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; WEISS; WARDROP, 2010).

A fração das globulinas agrupa as  $\alpha$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas e  $\gamma$ -globulinas. As  $\alpha$ -globulinas são divididas em dois grupos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) que agrupam principalmente proteínas de fase aguda, como  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina e proteína C. Dentre as  $\beta$ -globulinas ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) estão o fibrinogênio, proteína C reativa, ferritina, transferrina e o plasminogênio. Já as das  $\gamma$ -globulinas representam as imunoglobulinas circulantes (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

O fibrinogênio (Fb), além de sua função principal como precursor de fibrina na cascata de coagulação, é considerado uma proteína de fase aguda importante para os ruminantes, tido como melhor indicador de injúrias teciduais nessas espécies, quando comparado a contagem total de leucócitos analisada individualmente (SUTTON; HOBMAN, 1975; JAIN, 1993; JONES; ALLISON, 2007). Segundo Sutton e Hobman (1975), a relação entre proteína plasmática total e fibrinogênio (PPT:Fb) menor do que 15:1 indica aumento relativo do fibrinogênio. Além precoce nas reações inflamatórias, o aumento da concentração persiste durante a manutenção do estímulo inflamatório e decresce paulatinamente acompanhando a resolução do processo (SIMPLÍCIO *et al.*, 2013).

A avaliação correta das proteínas do soro deve considerar a relação albumina:globulina, uma vez que diminuições ou elevações de qualquer uma frações podem ser capazes de manter o valor da PT dentro dos parâmetros de normalidade, ou então, alterá-lo (FAGLIARI *et al.*, 1998; BATISTA DA SILVA *et al.*, 2008; WEISS; WARDROP, 2010).

A análise da atividade de enzimas e compostos bioquímicos séricos também podem contribuir para avaliação do estado dos animais, uma vez que reflete a situação metabólica dos tecidos (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003).

As funções hepáticas são analisadas rotineiramente na clínica veterinária por meio da dosagem da atividade sérica de determinadas enzimas que, em condições fisiológicas, apresentam baixas concentrações (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A enzima AST localiza-se no citoplasma e mitocôndrias de hepatócitos, células intestinais, do músculo cardíaco e esquelético e nas hemácias, tendo suas concentrações séricas aumentadas na lesão desses

tecidos, pelo extravasamento para a circulação (KANEKO; SMITH, 1964; RUSSELL; ROUSSEL, 2007). Mesmo considerada boa marcadora de hepatopatias nos bovinos (CEBRA *et al.*, 1997), outras enzimas hepáticas devem ser analisadas em conjunto com a AST, uma vez que a enzima está presente em vários tecidos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A elevação de AST como indicadora de dano muscular pode ser descartada dosando-se a enzima CK. Esta, apesar de ser encontrada tanto no músculo esquelético, quanto no músculo cardíaco, cérebro e nervos, tem maior especificidade para dano muscular. Sua elevação ocorre antes da AST, persistindo em altas concentrações durante o dano muscular (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Clark *et al.* (1987) demonstraram o aumento de cinquenta vezes nos níveis séricos de CK em vacas com início de miosite em decorrência de síndrome da vaca caída, e redução para dez vezes dos valores normais dentro de sete dias após o início da lesão.

A GGT é uma enzima ligada a membrana, presente principalmente nos tecidos com altas taxas de absorção e secreção, como o fígado e o rim. É considerada bom marcador de dano hepatobiliar em grandes animais, principalmente em colestase (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Em bovinos, seu aumento foi observado em animais com fasciolose aguda e crônica, além de outras alterações no parênquima hepático (BRAUN *et al.*, 1983).

Os rins, responsáveis por funções vitais como a excreção de nitrogênio, equilíbrio hidroeletrólítico e equilíbrio ácido-base, podem ser avaliados por meio da análise da concentração sérica de ureia e creatinina, prontamente filtrados pelos glomérulos (RUSSELL; ROUSSEL, 2007). Nos ruminantes a síntese de ureia ocorre no fígado, a partir de aminoácidos do catabolismo proteico e

absorção intestinal (ciclo da ureia). Logo, os níveis séricos são dependentes da dieta e principalmente da função hepática e renal (RUSSELL; ROUSSEL, 2007; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; CONCEIÇÃO, 2010). Já a creatinina é proveniente do metabolismo muscular, produto de degradação da creatina e fosfocreatina. Sua concentração sérica não varia de acordo com a dieta ou catabolismo de proteínas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; RUSSELL; ROUSSEL, 2007), sendo o composto de eleição para a análise da excreção renal em ruminantes. Ainda, a urinálise também é um exame de eleição para análise da função renal (RUSSELL; ROUSSEL, 2007).

### 3.6 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Proteínas de fase aguda (PFA), sintetizadas principalmente pelo fígado (MILLER *et al.*, 1951), são aquelas capazes de alterarem rapidamente suas concentrações plasmáticas pelo estímulo de citocinas pró-inflamatórias (principalmente interleucina 1 – IL-1, interleucina 6 – IL-6, e fator de necrose tumoral- $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) liberadas na lesão tecidual, infecções e inflamações. As substâncias localmente liberadas iniciam reações sistêmicas, como a febre, leucocitose e o estímulo para a síntese de PFA, desencadeando um evento chamado de resposta de fase aguda (RFA), tentativa do organismo para o retorno da homeostase (CECILIANI *et al.*, 2012; HORADAGODA *et al.*, 1999; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004). A RFA pode ser transitória, até o retorno do equilíbrio, ou persistente, nas doenças crônicas, em uma resposta crônica de fase aguda (MACKIEWICZ, 1997).

Acredita-se que a primeira observação sobre RFA se deva aos gregos antigos, pela distinção apontada entre a formação do coágulo sanguíneo de

peessoas saudáveis (homogêneo) e o de pessoas enfermas (com várias camadas)(MACKIEWICZ, 1997).

O termo “fase aguda” foi descrito pela primeira vez em 1941, em um artigo publicado pelos médicos Abernethy e Avery. A partir da observação de que uma substância, denominada C reativa, estava presente no soro de pacientes na fase aguda da pneumonia e não no soro de pacientes normais ou em recuperação. Prosseguindo o estudo, identificaram substância semelhante no soro de macacos infectados experimentalmente com o mesmo agente da pneumonia dos pacientes. Dessa forma, descreveram a existência de proteínas no soro de seres humanos e animais presentes durante a fase aguda de determinadas doenças e não em indivíduos hígidos (ABERNETHY; AVERY, 1941).

Hoje, sabe-se que são várias as PFA estimuladas ao mesmo tempo pelas citocinas pró-inflamatórias, e que nem todas apresentam alterações uniformes em cada doença ou espécie animal(CECILIANI *et al.*, 2012). Por isso, essas proteínas podem ser classificadas de acordo com sua concentração sérica durante a RFA, sendo chamadas positivas aquelas que têm sua concentração aumentada, e negativas aquelas que sofrem redução de concentração. Ainda, quanto à magnitude de mudança do estado de hígidez para o de fase aguda, as PFA positivas são classificadas como maiores, moderadas e menores (PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004; CECILIANI *et al.*, 2012).

Apesar de o comportamento das PFA ser espécie-específico, a albumina comporta-se como uma PFA negativa, com diminuições de 10% a 30% em todas as espécies de mamífero estudadas (MACKIEWICZ, 1997). Esse mecanismo disponibiliza um *pool* de aminoácidos livres, direcionados para gliconeogênese e síntese de novas proteínas (CECILIANI *et al.*, 2012).

Nos bovinos, de acordo com Horadagoda *et al.* (1999) e Ceciliani *et al.* (2012), as principais PFA identificadas como bons biomarcadores de processos inflamatórios são a Hp, a amiloide A sérica (SAA) (PFA maiores), a ceruloplasmina, o fibrinogênio e a  $\alpha$ 1- glicoproteína ácida (PFA moderadas). A Hp é a PFA mais amplamente estudada na espécie (HORADAGODA *et al.*, 1999).

### 3.6.1 Haptoglobina bovina

A Hp é uma glicoproteína plasmática, integrando as  $\alpha$ <sub>2</sub>-globulinas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A Hp bovina é composta por quatro cadeias estruturais ligadas por pontes dissulfeto, duas cadeias  $\alpha$  de 16 a 23 kDa e duas cadeias  $\beta$  de 35 a 40 kDa. No entanto, pode ser encontrada no soro em polímeros com peso molecular de 1000 a 2000 kDa (MORIMATSU *et al.*, 1992).

A proteína tem a capacidade de ligação estável com a hemoglobina livre (Hb), formando pontes Hp-Hb. A formação desses complexos é importante nos casos de hemólise intravascular, onde o tamanho elevado da molécula impede a perda renal de Hb e, conseqüentemente, a lesão glomerular pela nefrotoxicidade da Hb (ALLISON; REES, 1957).

Adicionalmente, a ligação com a Hb confere à Hp o papel de antioxidante pela estabilização do ferro, reduzindo danos teciduais pelo estresse oxidativo (MELAMED-FRANK *et al.*, 2001). A estabilização do ferro também o torna indisponível para microrganismos, configurando o efeito bacteriostático da Hp (EATON *et al.*, 1982). A formação desses complexos ocorre até a saturação da capacidade de ligação da Hp (ALLISON; REES, 1957). Assim como o principal sítio catabólico da Hp é o sistema retículo endotelial, a remoção dos complexos



Hp-Hb e, portanto, o *clearance* de Hb, também ocorrem nesse sistema (KRAUSS; SARCIONE, 1966).

Os primeiros estudos envolvendo a proteína voltavam-se para a investigação da importância de sua ligação com a Hb durante a hemólise intravascular (NEUHAUS; SOGOIAN, 1961; BREMNER, 1964). No entanto, Bremner (1964) demonstrou a baixa concentração de Hp no soro de bovinos saudáveis, sendo que em nove, dos 15 animais testados, não foi possível a detecção da proteína.

O avanço nas pesquisas sobre PFA e a popularização do seu uso na avaliação clínica e laboratorial em seres humanos, contribuiu para a intensificação do estudo das PFA medicina veterinária (ECKERSALL; CONNER, 1988). Na espécie bovina, a Hp tornou-se uma das PFA mais exploradas, principalmente pelo fato de sua quase ausência da proteína na circulação em indivíduos saudáveis (ECKERSALL; CONNER, 1988; MORIMATSU *et al.*, 1992; CECILIANI *et al.*, 2012) e por ser a PFA mais proeminente durante a RFA (ALSEMGEEST *et al.*, 1994).

Skinner, Brown e Roberts (1991) mensuraram Hp em vacas em condições de campo. Nesse estudo, animais com doenças não inflamatórias (hipocalcemia puerperal e cetose) e com endometrite crônica, não apresentaram mudanças significativas na concentração da proteína. Ao passo que, em desordens inflamatórias agudas (mastite e metrites severas e retenção de placenta), houve aumento significativo. Anos mais tarde, esse achado foi corroborado por Alsemgeest *et al.* (1994) e Horadagoda *et al.* (1999). Neste último, na diferenciação entre enfermidades agudas e crônicas, SAA apresentou 100 % de sensibilidade e a Hp 76% de especificidade.

A dinâmica das PFA (ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e Hp) foram estudadas por Fagliari *et al.* (2003) dentro de seis horas depois da indução de pneumonia por *Mannheimia haemolytica* em bezerros da raça Holandesa. Todas as PFA analisadas, tiveram aumento em relação à concentração basal, no entanto, a Hp teve o menor aumento dentre as demais. Os autores sugeriram a possibilidade da mensuração de PFA para a detecção de doenças inflamatórias ainda em seu estágio prodrômico.

Horadagoda *et al.* (1994) realizaram experimento semelhante, mensurando a concentração de TNF- $\alpha$ , SAA e Hp. Apenas a Hp não apresentou variação significativa.

Fagliari *et al.* (2007) analisaram o proteinograma sérico, por meio de eletroforese, em bezerros Nelore, entre seis e doze meses de idade, submetidos à fotossensibilização hepatógena. Quando comparado ao grupo controle, o grupo fotossensibilizado teve aumento na concentração sérica de Hp de  $377,3 \pm 43,6\%$  dentro de 12 a 24 horas após o início da dermatite, e de  $122,7 \pm 9,8\%$  de 15 a 30 dias depois da resolução do quadro. Nesses dois momentos avaliados, as concentrações de ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-antitripsina e  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida também aumentaram, porém, menos que a Hp.

Eckersall *et al.* (2001) demonstraram o aumento significativo nas concentrações séricas e no leite de Hp, SAA em vacas com mastite leve e moderada. Ainda, concluíram haver correlação positiva entre as concentrações séricas e no leite de Hp. No entanto, apenas as concentrações de SAA no leite apresentaram diferenças significativas entre os graus de mastite. No mesmo ano, Ohtsuka *et al.* (2001) também demonstraram o aumento das concentrações séricas de Hp em vacas com mastites por coliformes.

Suojala *et al.* (2008) analisaram a variação nas concentrações séricas e no leite das PFA Hp, SAA e proteína ligante de lipopolissacarídeo LBP, também em vacas com mastite induzida por *Escherichia coli*, encontrando também aumentos significativos em relação as concentrações basais. Esses e vários outros estudos demonstraram o potencial papel das PFA no diagnóstico precoce e monitoramento da mastite bovina (CECILIANI *et al.*, 2012).

Huzzey *et al.* (2009) descreveram o valor preditivo da Hp para metrite em vacas onde as concentrações foram  $\geq 1$  g/L no terceiro dia após o parto. Essas fêmeas foram 6,7 vezes mais propensas ao desenvolvimento de metrite grave e moderada. Ceciliani *et al.* (2012), em sua abrangente revisão sobre PFA em ruminantes, consideraram a concentração de Hp  $1,62 \pm 0,47$  g/L, descrita por Huzzey *et al.* (2009), como valor de referência para bovinos em RFA e  $>0,1$  g/L para bovinos saudáveis.

Schneider, Corrêa e Butler (2013), também estudando o comportamento de PFA em metrites pós-parto em vacas leiteiras, encontraram uma diminuição significativa de albumina ( $< 3,5$  g/L) 21 dias antes da data prevista para o parto, que determinou o valor preditivo de 79,3% para o desenvolvimento de metrites no pós parto. Esses resultados foram acompanhados por diminuição da PFA negativa para oxonase (PON), a qual apresentou comportamento semelhante em estudo anterior (BIONAZ *et al.*, 2007), e aumento nos valores séricos de Hp sete dias após o parto, em vacas multíparas.

O comportamento da Hp perante algumas doenças virais também foi avaliado. Apesar de alguns estudos não apontarem alterações na dinâmica da Hp em infecções virais em bovinos (ECKERSALL; CONNER, 1988) Höfner *et al.* (1994) demonstraram o aumento da concentração sérica de Hp em bovinos

infectados pelo vírus da febre aftosa após oito e nove dias da infecção, coincidindo com o aparecimento das primeiras vesículas. Heegaard *et al.* (2000) descreveram o aumento da Hp e SAA sérica em bezerros infectados pelos vírus da doença respiratória sincicial bovina (BRSV) após oito dias da infecção. Ulutas *et al.* (2011) também relataram o aumento significativo nos níveis plasmáticos de Hp e SAA em vacas leiteiras persistentemente infectadas (PI) pelo vírus da diarreia viral bovina (BVD), sem sinais clínicos.

Simplício *et al.* (2013), ao analisarem o proteinograma sérico de bovinos saudáveis e com doenças agudas (mastite estafilocócicas, fotossensibilização hepatógena e onfaloflebite), encontraram maior sensibilidade da Hp e da ceruloplasmina, em relação a transferrina,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e ao fibrinogênio, como biomarcadores precoces para essas doenças. No entanto, o comportamento de cada PFA analisadas diferiu entre as enfermidades, demonstrando a variabilidade das reações biológicas e a necessidade da avaliação de diferentes tipos de doenças e biomarcadores.

### 3.7 REFERÊNCIAS

ABERNETHY, T. J.; AVERY, O. T. the Occurrence During Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood I. Distribution of the Reactive Protein in Patients' Sera and the Effect of Calcium on the Flocculation Reaction With C Polysaccharide of Pneumococcus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 73, n. 2, p. 173–82, 1941.

ALLISON, A. C.; REES, W. The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobins) - its bearing on the “renal threshold” for haemoglobin and the aetiology of haemoglobinuria. **British Medical Journal**, v. 2, n. Nov. 16, p. 1137–1143, 1957.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. **Le Lait**, v. 78, n. 4, p. 413–423, 1998.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 549–553, 2001.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 6, p. 675–86, 2002.

ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; DE JONGH, F. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. **Le Lait**, v. 73, n. 3, p. 323–332, 1993.

ALONSO-AMELOT, M. E.; RODULFO-BAECHLER, S.; JAIMES-ESPINOZA, R. Comparative dynamics of ptaquiloside and pterisin B in the two varieties (caudatum and arachnoideum) of neotropical Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*

L. Kuhn). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 7–8, p. 709–716, nov. 1995.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: An epidemiologic study. **International Journal of Cancer**, v. 91, n. 2, p. 252–259, 2001.

ALSEMGEEEST, S. P. M. et al. Concentrations of serum Amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 21–23, 1994.

ANJOS, B. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 501–507, 2008.

ARANHA, P. C. R. et al. Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. **Journal of Chromatography. B**, v. 951–952, p. 44–51, 1 mar. 2014.

AYRES, M. C. C. et al. Avaliação da influência de fatores relacionados ao sexo sobre a variabilidade do eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 2, p. 31–36, 2001.

BATISTA DA SILVA, E. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2191–2196, 2008.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and

liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1740–1750, 2007.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1–9, 2001.

BRAUN, J. P. et al. Gamma Glutamyl Transferase in domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 6, n. 1, p. 77–90, 1983.

BREMNER, K. C. Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 42, p. 643–656, 1964.

CAMPO, M. S. Bovine Papillomavirus and Cancer. **The Veterinary journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.

CARDOSO, N. *Pteridium catalensis* sp. nov., uma nova pteridófito fóssil do complexo carbinalítico Catalão I, Goiás. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v. 9, n. 3, p. 303–310, 2006.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 336–346, 2006.

CEBRA, C. K. et al. Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 231–237, 1997.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**,

v. 75, n. 14, p. 4207–4231, 2012.

CLARK, R. G. et al. The ability of biochemical and haematological tests to predict recovery in periparturient recumbent cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, n. 8, p. 126–133, 1987.

CONCEIÇÃO, W. L. F. **Perfil bioquímico sérico de vacas das raças nelore e Girolanda sororreagentes ou não à brucelose e leptospirose no estado do Maranhão - Brasil**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP, Campus de Jaboticabal, 2010.

COQUILLAT, M. Au sujet du “ pain de fougère ” en Maconnais. **Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon**, v. 19, p. 173–176, 1950.

CURIAL, O. **Hematúria Enzoótica dos Bovinos. Observações Anatomopatológicas. Tese de Mestrado**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 1964.

DE SILVA, Ú. S. R.; MATOS, D. M. DA S. The invasion of *Pteridium aquilinum* and the impoverishment of the seed bank in fire prone areas of Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 9, p. 3035–3043, 2006.

DER, J. P. et al. Global Chloroplast Phylogeny and Biogeography of Bracken (*Pteridium* ; *Dennstaedtiaceae*). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência Da Hematúria Enzoótica E De Carcinomas Epidermóides No Trato Digestivo Superior Em Bovinos No Brasil . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 489–504, 1967.



EATON, J. W. et al. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, v. 215, n. 4533, p. 691–3, 1982.

ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v. 148, n. 2, p. 35–41, 2001.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 12, p. 169–178, 1988.

EVANS, I. A. The radiomimetic nature of bracken toxin. **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2252–2261, 1968.

EVANS, I. A. Relationship between bracken and cancer. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 73, n. 1, p. 105–112, 1976.

FAGLIARI, J. J. et al. Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 263–271, 1998.

FAGLIARI, J. J. et al. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 383–387, 2003.

FAGLIARI, J. J. et al. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1355–1358, 2007.

FALBO, M. K. et al. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 547–558, 2005.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) -Toxic Effects and Toxic Constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 46, n. 1, p. 147–173, 1988.

FRANÇA, T. DO N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 85–96, 2002.

FURLAN, F. H. et al. Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematúria enzoótica bovina 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 753–759, 2014.

GALVÃO, A. et al. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 887–902, 2012.

GEORGE, J. W.; SNIPES, J.; LANE, V. M. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 138–148, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil Sangüíneo: Ferramenta De Análise Clínica, Metabólica E Nutricional. In: GONZÁLEZ, F. .; CAMPOS, R. (Eds.). . **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 73–89.

GREGORY, L. et al. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos.

**Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 339–345, 2004.

HADWEN, S. Bovine hæmaturia. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 31, p. 64–70, 1918.

HEEGAARD, P. M. H. et al. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1–2, p. 151–159, 2000.

HIRONO, I. et al. Studies on Carcinogenic Properties of Bracken, *Pteridium aquilinum*. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 45, n. 1, p. 179–188, 1970.

HIRONO, I. et al. Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. **Cancer Letters**, v. 21, n. 3, p. 239–246, 1984a.

HIRONO, I. et al. Carcinogenicity in Rats of Ptaquiloside Isolated from Bracken. **Gann**, v. 75, n. 10, p. 833–836, 1984b.

HIRONO, I. et al. Reproduction of Progressive Retinal Degeneration (Bright Blindness) in Sheep by Administration of Ptaquiloside Contained Bracken. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 6, p. 979–983, 1993.

HÖFNER, M. C. et al. Haptoglobin response of cattle infected with foot-and-mouth disease virus. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 1, p. 125–128, 1994.

HORADAGODA, A. et al. Immediate responses in serum TNF alpha and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. **Research in veterinary science**, v. 57, n. 1, p. 129–132, 1994.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record** , v. 144, n. 16, p. 437–441, 1999.

HUZZEY, J. M. et al. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 621–625, 2009.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 377–402, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KANEKO, J. J.; SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **California Veterinarian**, v. 21, n. 4, p. 21–24, 1964.

KRAUSS, S.; SARCIONE, E. J. Role of the Liver in the Catabolism of Serum Haptoglobin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 122, n. 31514, p. 1019–1022, 1966.

LE DUC, M. G.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Changes in the rhizome system of bracken subjected long-term experimental treatment. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, n. 3, p. 508–522, 2003.

MACKIEWICZ, A. Acute phase proteins and transformed cells. **International Review of Cytology**, v. 170, n. 0074–7696, p. 225–300, 1997.

MADEJA, J. et al. Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), Mistletoe (*Viscum album* (L.)) and Bladder-nut (*Staphylea pinnata* (L.))-Mysterious Plants with

Unusual Applications. Cultural and Ethnobotanical Studies. **Plants and cultural: seeds of the cultural heritage of Europe**, p. 207–215, 2009.

MARÇAL, W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Aberdeen Angus. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 77–81, 2002.

MARÇAL, W. S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1998, p. 197–208, 2003.

MARLIÉRE, C. A. et al. Ingestão de broto de samambaia e risco de câncer de esôfago e estômago na região de Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 44, n. 3, p. 225–229, 1998.

MATOKA, M. et al. Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, v. 2, n. 6, p. 419–423, 1987.

MATSUOKA, A. et al. Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes - II. Chromosomal aberration test with cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 215, n. 2, p. 179–185, dez. 1989.

MCKENZIE, R. A. Bovine enzootic haematuria in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 61–4, 1978.

MELAMED-FRANK, M. et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3693–8, 2001.

MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames, IA, United States: Iowa State University Press, 2016.

MILLER, L. L. et al. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 94, p. 431–453, 1951.

MOREIRA SOUTO, M. A. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 112–122, 2006.

MORI, H. et al. Genotoxicity of ptaquiloside, a bracken carcinogen, in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. **Mutation Research**, v. 143, p. 75–78, 1985.

MORIMATSU, M. et al. Bovine haptoglobin: Single radial immunodiffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute-phase sera. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 33, n. 4, p. 365–372, 1992.

NAGAO, T. et al. Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes - I. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, v. 215, n. 2, p. 173–178, dez. 1989.

NEUHAUS, O. W.; SOGOIAN, V. Presence of Haptoglobin in Synovial Fluid. **Nature**, v. 192, n. Nov. 11, p. 558–559, 1961.

NIWA, H. et al. Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 48, p. 5371–5372, 1983.

OHTSUKA, H. et al. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **The Journal of veterinary medical science**, v. 63, n. 6, p. 675–678, 2001.

OJIKI, M. et al. Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern

*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*: structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino acids, nucleosides, and nucleotides. **Tetrahedron**, v. 43, n. 22, p. 5261–5274, 1987.

OJIKAWA, M. et al. Modification and cleavage of DNA by ptaquiloside. A new potent carcinogen isolated from bracken fern. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 22, p. 1775–1777, 1989.

ÖZKUL, I. A.; AYDIN, Y. Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 4, p. 473–475, 1996.

PAES, P. R. DE O. et al. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 305–312, 2012.

PAGE, C. N. The taxonomy and phytogeography of bracken - a review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 73, n. 1–3, p. 1–34, 1976.

PAMUKCU, A. M. Tumors of the Urinary Bladder in Cattle and Water Buffalo Affected with Enzootic Bovine Hematuria. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 4, n. 2, p. 185–197, 1957.

PAMUKCU, A. M. Epidemiologic Studies on Urinary Bladder Tumors in Turkish Cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 938–947, 1963.

PAMUKCU, A. M. et al. Quercetin, a Rat Intestinal and Bladder Carcinogen Present in Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p. 3468–3472, 1980.

PAMUKCU, A. M.; GÖKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary Bladder Neoplasms Induced by Feeding Bracken Fern (*Pteris aquilina*) to Cows. **Cancer Research**, v. 27, n. MAY, p. 917–924, 1967.

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. T. Naturally Occurring and Bracken-Fern-Induced Bovine Urinary Bladder Tumors: Clinical and Morphological Characteristics. **Veterinary Pathology Online**, v. 13, p. 110–122, 1976.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163–187, mar. 2004.

PRAKASH, A. S. et al. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural toxins**, v. 4, n. 5, p. 221–7, 1996.

PRICE, J. M.; PAMUKCU, A. M. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2247–2251, 1968.

RECOUSO, R. et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 22–29, 2003.

ROOS, K. et al. Growth of Tropical Bracken (*Pteridium arachnoideum*): Response to Weather Variations and Burning. **Invasive Plant Science and Management**, v. 3, n. 4, p. 402–411, 2010.

RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403–426, 2007.



SAITO, K. et al. Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of pteridium aquilinum, and the distribution of related compounds in the pteridaceae.

**Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1605–1611, jan. 1989.

SAITO, K. et al. The sesquiterpenoid carcinogen of bracken fern, and some analogues, from the pteridaceae. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1475–1479, 1990.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A. et al. Observaciones Clínico Patológicas En Vacas Con Hematuria Enzoótica Bovina. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. XIV, n. 4, p. 317–323, 2004.

SCHALM, O. W. Leukocyte responses to disease in various domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 140, p. 557–563, 1962.

SCHMIDT, B. et al. Genotoxic activity and inhibition of soil respiration by ptaquiloside, a bracken fern carcinogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 2751–2756, 2005.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 269–271, 2013.

SHAHIN, M. et al. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 244, n. 1, p. 192–7, 6 mar. 1998a.

SHAHIN, M. et al. H-ras activation is an early event in the ptaquiloside-induced

carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 250, n. 2, p. 491–7, 18 set. 1998b.

SHAHIN, M.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in the human diet. **Mutation Research**, v. 443, n. 1–2, p. 69–79, 1999.

SILVA, M. A. DA et al. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1847–1850, 2009.

SILVA MATOS, D.; BELINATO, T. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, maio 2010.

SIMPLÍCIO, K. M. M. G. et al. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1339–1347, 2013.

SKINNER, J. G.; BROWN, R. A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **The Veterinary record**, v. 128, n. 7, p. 147–9, 1991.

SMITH, B. L.; BEATSON, N. S. Bovine Enzootic Haematuria in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 18, p. 115–120, 1970.

SNOW, C. S. R.; MARRS, R. H. Restoration of *Calluna* heathland on a bracken *Pteridium* - infested site in north west England. **Biological Conservation**, v. 81, n. 1–2, p. 35–42, 1997.

SOUZA, M. V.; GRAÇA, D. L. Intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Polypodiaceae) em bovinos. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 203–207, 1993.

SUNDERMAN, F. M. Bracken poisoning in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 1, p. 25–26, 1987.

SUOJALA, L. et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2008.

SUTTON, R. H.; HOBMAN, B. The value of plasma fibrinogen estimations in cattle: A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, n. 3, p. 21–27, 1975.

THOMAS, B.; WALKER, H. F. The inactivation of thiamin by bracken (*Pteris aquilina*). **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 68, p. 6–9, 1949.

THOMSON, J. A. Towards a taxonomic revision of *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). **Telopea**, v. 10, n. 4, p. 793–803, 2004.

THOMSON, J. A.; MICKEL, J. T.; MEHLTRETER, K. Taxonomic status and relationships of bracken ferns ( *Pteridium* : Dennstaedtiaceae ) of Laurasian affinity in Central and North America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, p. 1–17, 2008.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 329–336, 1967.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência Da Hematuria Enzoótica e de Carcinomas Epidermóides no Trato Digestivo Superior em Bovinos no Brasil . II. Estudos Complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 209–224, 1969.

ULUTAS, B. et al. Haptoglobin and Serum Amyloid A Responses in Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p. 1–6, 2011.

WANG, C. Y. et al. Identification of Carcinogenic Tannin Isolated From Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 1, p. 33–36, 1976.

WATT, A. S. Contributions to the ecology of bracken (*Pteridium aquilinum*). I. The Rhizome. **New Phytologist**, v. 39, n. 4, p. 401–422, 1940.

WEISS, D. J.; PERMAN, V. Assessment of the Hematopoietic System In Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 8, n. 2, p. 411–428, jul. 1992.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

WESWIG, P. H.; FREED, A. M.; HAAG, J. R. Antithiamine activity of plant materials. **Journal of Biological Chemistry**, v. 165, p. 737–738, 1946.

XU, L. R. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 1, p. 116–121, 1992.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product**

**Reports**, v. 24, n. 4, p. 798–813, 2007.

## 4. CAPÍTULO 2

### **Parâmetros bioquímicos séricos e proteínas de fase aguda em bovinos com hematúria enzoótica**

*Serum biochemical parameters and acute phase proteins in cattle with  
enzootic hematuria*

#### RESUMO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma toxicose causada pela ingestão crônica de samambaia (*Pteridium* spp.) associada a formação de neoplasmas na vesícula urinária. Este estudo objetivou avaliar selecionados parâmetros bioquímicos séricos e a concentração da proteína de fase aguda (PFA) haptoglobina (Hp) em bovinos com HEB e compará-los com os parâmetros de animais saudáveis. Cinquenta vacas Nelore adultas com HEB foram separadas em dois grupos de acordo com a urinálise: Gmacro – 29 vacas com macrohematúria e Gmicro – 21 vacas com microhematúria. Sete vacas Nelore adultas saudáveis compuseram o grupo controle (Gc). Foram mensurados e comparados entre os três grupos os parâmetros bioquímicos séricos: proteína sérica total (PT), albumina, globulinas, ureia, creatinina, atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK); e a concentração da Hp. Adicionalmente, foi realizado o hemograma das vacas com HEB e os resultados comparados entre Gmacro e Gmicro. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações múltiplas dos parâmetros bioquímicos e Hp entre Gmacro, Gmicro e Gc ( $p<0.05$ ). Para a análise estatística do hemograma entre Gmacro e Gmicro utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Por não apresentarem distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p<0.05$ ). A concentração de Hp foi significativamente menor em Gc do que nos animais com HEB. As atividades séricas de AST e CK foram significativamente maiores em Gmacro e Gmicro. As concentrações de PT e globulina foram significativamente maiores em Gmicro. Dentre os parâmetros hematológicos com diferença significativa entre os grupos, pode-se observar menor contagem de eritrócitos, menor hematócrito e menores concentrações de Hb em Gmacro, provavelmente justificados pela hematúria. A contagem de leucócitos totais e neutrófilos segmentados também foi menor em Gmacro. Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a Hp indica a ocorrência de alterações sistêmicas provocadas pela HEB.

**Palavras-chave:** plantas tóxicas; haptoglobina; vaca.

## ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria (BEH) is a toxicose caused by the chronic intake of bracken fern (*Pteridium* spp.) associated with urinary bladder neoplasms formation. This study aimed to evaluate selected serum biochemical parameters and the concentration of the acute phase protein (APP) haptoglobin (Hp) in cattle with BEH and to compare them with healthy animals parameters. Fifty adult Nelore cows with HEB were separated into two groups according to urinalysis: Gmacro - 29 cows with macrohematuria and Gmicro - 21 cows with microhematuria. Seven healthy adult Nelore cows composed the control group (Gc). Serum biochemical parameters: total serum protein (PT), albumin, globulin, urea, creatinine, serum enzyme activity aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT) and creatine kinase (CK); and the concentration of Hp were measured and compared between the three groups. In addition, the hemogram of the cows with HEB and the results compared between Gmacro and Gmicro were performed. The nonparametric Kruskal-Wallis test and the Dunn's post-test were used for multiple comparisons of biochemical parameters and Hp between Gmacro, Gmicro and Gc ( $p < 0.05$ ). For the haematological statistical analysis between Gmacro and Gmicro, Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normality of the data distribution. Because of the distribution was not normal, the nonparametric Mann-Whitney test was used ( $p < 0.05$ ). The concentration of Hp was significantly lower in Gc than in the animals with BEH. Serum AST and CK activity were significantly higher in Gmacro and Gmicro. PT and globulin concentrations were significantly higher in Gmicro. Among the haematological parameters with significant difference between the groups, it is possible to observe a lower erythrocyte count, lower hematocrit and lower Hb concentrations in Gmacro, probably justified by hematuria. The total leukocyte count and segmented neutrophils were also lower in Gmacro. The results obtained in this study allow us to conclude that Hp indicates the occurrence of systemic alterations caused by BEH.

**Keywords:** toxic plants; haptoglobin; cow.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A HEB é uma doença causada pela ingestão crônica de samambaia (*Pteridium* spp.) (TOKARNIA *et al.*, 2012), apresentando ocorrência mundial, a qual acompanha a distribuição da planta e sua presença na área de pastejo dos bovinos (FENWICK, 1988). O principal componente tóxico presente na samambaia é o Pt, um glicosídeo com capacidades carcinogênicas (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007), o qual induz alterações principalmente alterações hiperplásicas e neoplásicas na vesícula urinária (PAMUKCU; GÖKSOY; PRICE, 1967). Clinicamente os bovinos apresentam hematúria intermitente ou contínua, (resultado das alterações na parede da vesícula urinária), anemia e prostração. As principais alterações laboratoriais encontradas são anemias progressiva, redução do hematócrito e da concentração de Hb, leucopenia e neutropenia (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002). A avaliação clínico-laboratorial de animais com microhematúria ou em períodos remissivos da doença pode ser prejudicado, pois nessas situações, os parâmetros hematológicos não apresentam alterações significativas (FALBO *et al.*, 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos e a dinâmica da PFA Hp em vacas Nelore saudáveis e com HEB oriundas de propriedades com histórico da doença e com a presença de samambaia nos pastos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Seleção das propriedades e dos animais

Para o estudo foram utilizadas 57 vacas (dois a quinze anos de idade), da raça Nelore e Mestiças Nelore. Os animais pertenciam a oito propriedades



privadas de bovinos de corte, com criação extensiva e semelhante manejo sanitário e nutricional. Destas, seis localizavam-se em municípios próximos à Curitiba (Fazenda Rio Grande – latitude: 25° 39' 28" S, longitude: 49° 18' 28" O; altitude: 910m; área: 116,676 Km<sup>2</sup> -, Rio Branco do Sul – latitude: 25° 11' 24" S, longitude: 49° 18' 50" O; altitude: 885m; área: 814,361 Km<sup>2</sup> -, Bocaiuva do Sul – latitude: 25° 12' 21" S, longitude: 49° 06' 54" O; altitude: 980m; área: 826,344 Km<sup>2</sup> -, Doutor Ulysses – latitude: 24° 04' 34" S, longitude: 49° 25' 12" O; altitude: 795m; área: 781,447 Km<sup>2</sup> -, e Adrianópolis - latitude: 24° 39' 26" S longitude: 48° 59' 28" O; altitude: 250m; área: 1.333 Km<sup>2</sup> -, na Região Metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, e Ribeira - latitude: 24° 39' 25" S, longitude: 49° 00' 32" O; altitude: 167m; área: 335,7 Km<sup>2</sup> -, na Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo), onde a HEB é frequente (GROXCO *et al.*, 2017).

Amostras de sete animais foram colhidas em outras duas propriedades sem a presença de *Pteridium arachnoideum* e sem o histórico da hematúria enzoótica dos bovinos, uma no município de Nova Prata do Iguaçu (latitude: 25° 37' 58" S, longitude: 53° 20' 49" O; altitude: 438m; área: 352,565Km<sup>2</sup>), na Região Sudoeste do Paraná e outra no município de Botucatu (latitude: 22° 53' 09" S, longitude: 48° 26' 42" O; altitude: 840m; área: 1482,874Km<sup>2</sup>), na Região de Botucatu, Estado de São Paulo. Esses sete animais compuseram o **Gc - grupo controle**.

Todos os animais foram submetidos à inspeção geral visual antes da colheita de material, eram vacinados contra Febre Aftosa e Brucelose de acordo com as legislações vigentes de sanidade animal no Brasil (BRASIL, 2009) e não foram vermifugados ou vacinados dentro de um mês antes da amostragem.

Foram colhidas amostras de sangue, urina e fezes no período de setembro de 2016 a dezembro de 2017.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, sob o protocolo nº 076/2016.

#### 4.2.2 Amostras de urina

Foram coletadas amostras de urina (60 mL) das 50 vacas oriundas das propriedades onde HEB era frequente. O material foi obtido por micção estimulada por massagem perineal e perivulvar, após limpeza com toalha de papel descartável. Os exames físico-químicos foram realizados logo após a coleta. Para os demais procedimentos, o material foi acondicionado em frascos estéreis, refrigerado a 4°C e encaminhado no prazo máximo de seis horas ao Laboratório de Patologia Clínica de Medicina Veterinária da UFPR, Curitiba, Paraná. Procederam-se a sedimentoscopia e citologia urinária após o retorno da amostra a temperatura ambiente e homogeneização.

##### 4.2.2.1 Exames físico-químicos

Os exames físico-químicos da urina foram realizados conforme preconiza Kantek Garcia-Navarro (1996). Para o exame físico foram caracterizados o volume, a cor, aspecto e densidade urinária (aferida pelo refratômetro). O exame químico foi feito por meio de tiras reagentes comerciais (Urofit 10 DL, Fita Reativa para Uroanálise, Alere Inc., EUA), para avaliação da presença de proteína e sangue oculto. Para análise dos dados, atribuiu-se escores para cor (1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho), aspecto (1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo; 4= presença de coágulo), e presença de proteína e sangue oculto (1= negativo; 2= positivo).

#### 4.2.2.2 Sedimentoscopia urinária

Para as análises do sedimento urinário, as amostras foram centrifugadas ( $1200 \times g$  por 5 minutos), desprezando-se o sobrenadante. Após ressuspensão do sedimento, 20  $\mu\text{L}$  foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula para análise microscópica. Foram avaliados e atribuídos escores em campo de maior aumento (CMA) para hemácias (1= ausência ( $\leq 6/\text{CMA}$ ); 2= presença ( $\geq 7/\text{CMA}$ ); 3= abundante ( $\geq 100/\text{CMA}$ )), leucócitos (1= negativo ( $\leq 3/\text{CMA}$ ); 2= positivo ( $\geq 4/\text{CMA}$ )), células de descamação epitelial (1= ausência (0/CMA); 2= ocasional ( $\leq 2/\text{CMA}$ ), 3= moderado ( $\geq 3/\text{CMA}$ ), 4= abundante ( $\geq 5/\text{CMA}$ )), e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).

A análise do sedimento corado também foi realizada utilizando-se coloração de Wright (KRAFTS; PAMBUCCIAN, 2011). Foram avaliados e atribuídos escores para hemácias (1= ausência ( $\leq 6/\text{CMA}$ ); 2= presença ( $\geq 7/\text{CMA}$ )) e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).

#### 4.2.3 Amostras de sangue

Amostras de sangue foram colhidas em duplicata por punção de vasos coccígeos em tubos secos de 10 mL (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Brasil) e em tubos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de 5 mL (BD Vacutainer® EDTA K2, Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Brasil) e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR, Curitiba, Paraná, no período máximo de seis horas para o processamento. As amostras com ativador de coágulo foram centrifugadas ( $1500 \times g$  por 5 minutos) e os soros foram destinados às análises bioquímicas séricas e alíquotas foram armazenadas em microtubos do tipo

eppendorf, em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem de haptoglobina. Nos animais do Gc apenas amostras sem anticoagulantes foram obtidas, para determinas os parâmetros bioquímicos séricos foram avaliados no estudo.

#### 4.2.3.1 Perfil bioquímico sérico

A concentração no soro de PT, albumina, globulinas, ureia e creatinina e as atividades séricas das enzimas AST, GGT e CK, foram determinadas por analisador químico automático (BS-200, Analisador Químico, Mindray, Shenzhen, China), seguindo as instruções do fabricante, utilizando kits comerciais (para CK: Kovalent®, Biosys/Kovalent, Rio de Janeiro, Brasil; para as demais: Dialab®, DIALAB GmbH, Viena, Áustria).

A concentração de Hp no soro foi mensurada por meio de um ensaio de ligação de hemoglobina previamente validado para o uso em bovinos (ECKERSALL *et al.*, 1999), utilizando analisador automático (BS-200, Analisador Químico, Mindray, Shenzhen, China) e controle padrão comercial de Hp (Haptogloblin control Set, Tridelta Development Limited, Co. Kildare, Irlanda).

#### 4.2.3.2 Hematologia

As amostras com anticoagulante foram utilizadas para a realização do hematócrito (técnica de micro hematócrito (JAIN, 1986)) e contagem de eritrócitos, leucócitos, determinação de hemoglobina e cálculo dos índices hematimétricos por meio de analisador hematológico automático (BC-2800Vet, Analisador Hematológico Automático, Mindray, Shenzhen, China). Realizou-se o esfregaço sanguíneo (coloração pela técnica do Panótico Rápido e leitura das lâminas na objetiva de imersão – 1000x) para análise morfológica, contagem de

plaquetas e contagem diferencial de leucócitos. O fibrinogênio foi determinado pelo método de precipitação por calor e refratometria, conforme descrito por Kaneko e Smith (1964).

#### 4.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando software estatístico (GraphPad Prism Version 6.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados referentes à urinálise, hemograma, parâmetros bioquímicos séricos e haptoglobina foram comparados entre os grupos.

Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Por não apresentarem distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparações dos parâmetros da urinálise e hemograma entre os grupos. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações múltiplas dos parâmetros, bioquímicos e concentração de haptoglobina entre os grupos. Os dados são apresentados em mediana, amplitude de variação (mínimo e máximo) e percentis (25% e 75%). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

### 4.3 RESULTADOS

A partir dos resultados das 50 urinálises, os animais foram divididos em dois grupos para o estudo: **Gmacro – grupo macrohematúria** (coloração da urina visualmente alterada; positivo para sangue oculto; escore 3 para hemácias no sedimento), com 29 animais, e **Gmicro – grupo microhematúria** (escores 1,2 e 3 para cor da urina; positivo para sangue oculto; escore 2 e 3 para hemácias no sedimento), com 21 animais. Os sete animais de **Gc** não apresentaram alterações à urinálise.

O teste estatístico utilizado para análise dos resultados da urinálise e hematologia foi diferente do utilizado para análise dos parâmetros bioquímicos e da haptoglobina. No primeiro caso, as comparações foram feitas entre **Gmacro** e **Gmicro** e, no segundo, entre **Gmacro**, **Gmicro** e **Gc**.

A análise dos resultados da urinálise são demonstrados na tabela 1. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Gmacro e Gmicro apenas para as variáveis coloração ( $p<0,05$ ), aspecto da urina ( $p<0,05$ ) e na proteinúria detectada por meio de fitas reagentes ( $p<0,05$ ).

A análise dos parâmetros hematológicos são apresentados nas tabelas 2 e 3. A contagem total de eritrócitos, o hematócrito, a concentração de Hb e a concentração de PPT foram significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) no grupo Gmacro. Não houve diferença estatística na contagem de plaquetas entre os grupos ( $p<0,05$ ). Os animais 1 de Gmacro e 1 de Gmicro foram desconsiderados da análise deste parâmetro por apresentarem agregamento plaquetário na leitura da extensão sanguínea.

Quanto ao leucograma, a contagem total de leucócitos e o número de neutrófilos segmentados foram menores ( $p<0,05$ ) em Gmacro, em relação a Gmicro (figura 2).

Os parâmetros bioquímicos analisados são mostrados na tabela 4. A concentração de proteína total e de globulinas de Gmicro foram estatisticamente superiores ( $p<0,05$ ) a concentração das variáveis no Gc. As atividades séricas das enzimas AST e CK nos grupos Gmacro e Gmicro diferiram significativamente ( $p<0,05$ ) do Gc, apresentando-se elevadas (figura 3). A atividade sérica de GGT

e as concentrações de ureia e creatinina permaneceram dentro dos limites de normalidade.

A maior concentração sérica de Hp foi observada no grupo Gmicro, porém, as concentrações entre Gmacro e Gmicro não diferiram entre si. Diferenças significativas só ocorreram quando esses grupos foram comparados individualmente com o Gc( $p<0,05$ ) (figura 3).

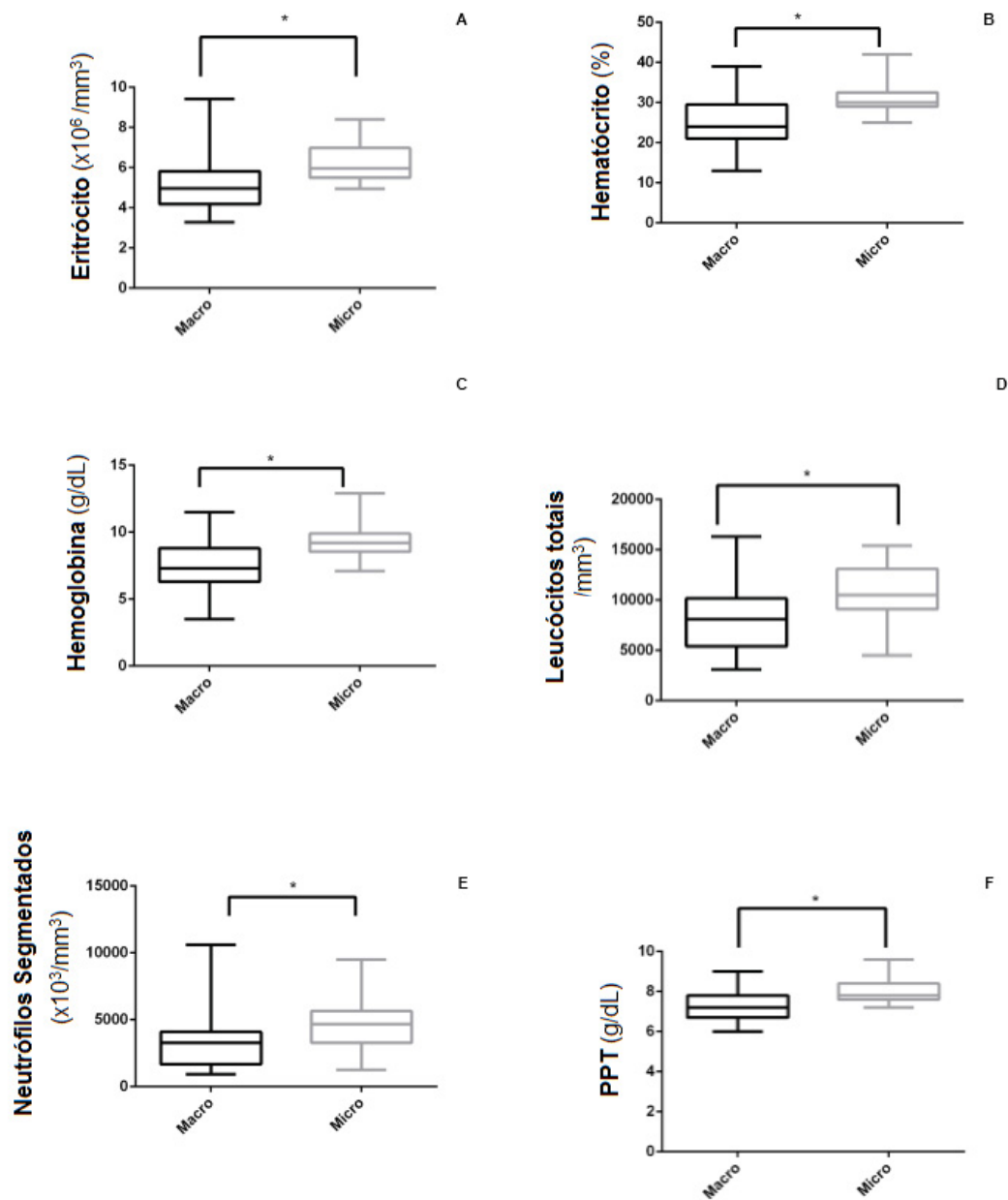


Figura 2. Parâmetros hematológicos em vacas com macrohematúria (Macro) e em vacas com microhematúria (Micro). Linhas horizontais representam a mediana e o intervalo interquartil. (A) eritrócitos; (B) hematócrito; (C) hemoglobina; (D) leucócitos totais; (E) neutrófilos segmentados; (F) proteínas plasmáticas totais (PPT). \* $p < 0,05$ .



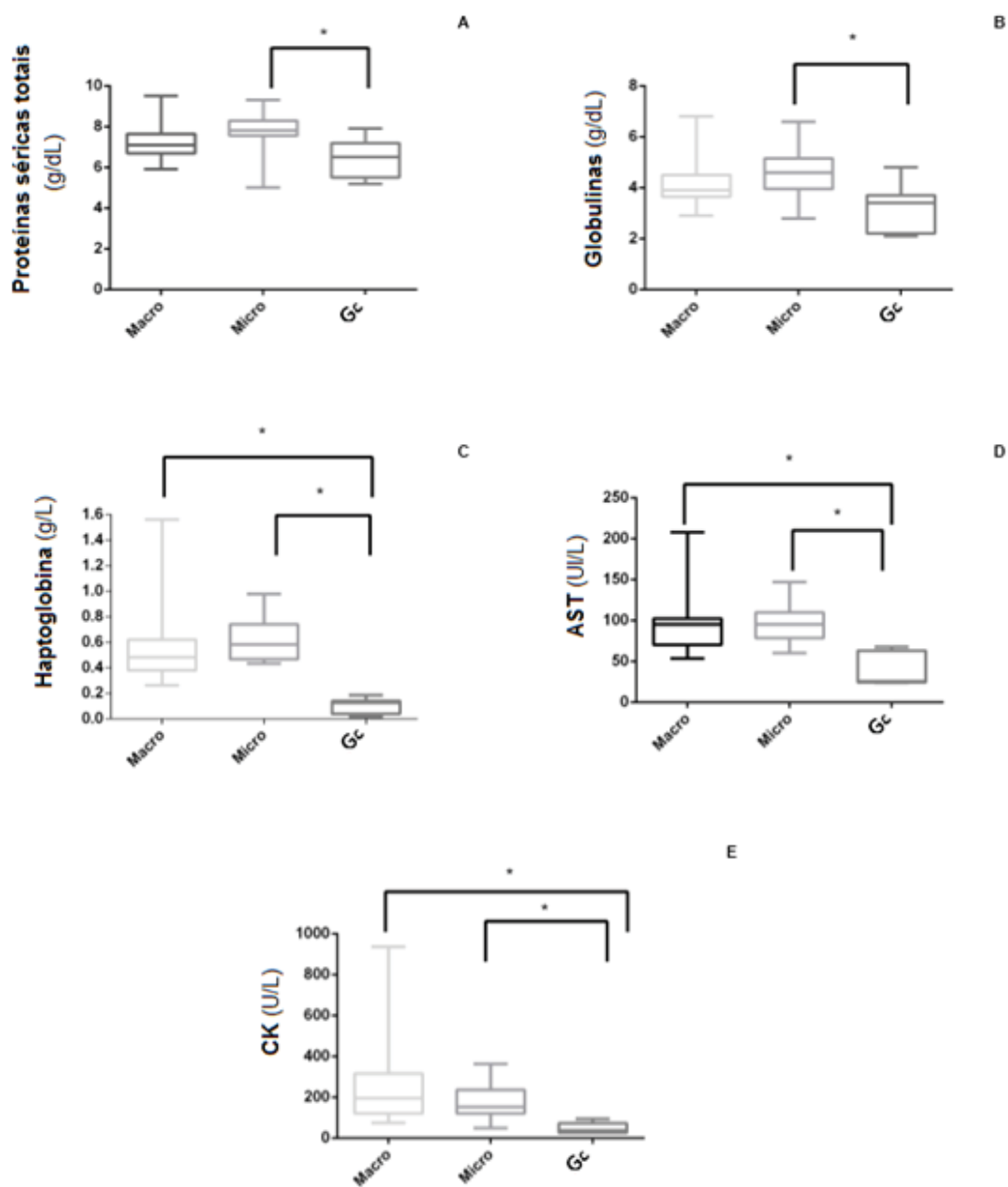


Figura 3. Parâmetros bioquímicos e atividade sérica de enzimas em vacas com macrohematúria (Macro), microhematúria (Micro) e no grupo controle (Gc). Linhas horizontais representam a mediana e o intervalo interquartil. (A) proteínas séricas totais; (B) globulinas; (C) haptoglobina; (D) AST; (E) CK. \* $p < 0,05$ .

Tabela 1. Urinálise de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%). Escores estabelecidos para as análises: coloração (1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho); aspecto (1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo; 4= presença de coágulo); proteinúria e sangue oculto (1= negativo; 2= positivo). No sedimento: hemácias (1= ausência ( $\leq 6$ /CMA); 2= presença ( $\geq 7$ /CMA); 3= abundante ( $\geq 100$ /CMA)), leucócitos (1= negativo ( $\leq 3$ /CMA); 2= positivo ( $\geq 4$ /CMA)), células de descamação epitelial (1= ausência (0/CMA); 2= ocasional ( $\leq 2$ /CMA), 3= moderado ( $\geq 3$ /CMA), 4= abundante ( $\geq 5$ /CMA)), e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença). Na citologia: hemácias (1= ausência ( $\leq 6$ /CMA); 2= presença ( $\geq 7$ /CMA)) e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).

Grupo	Gmacro	Gmicro	Valor de p
Densidade urinária	1.020 (1.005-1.032) (1.012-1.026)	1.016 (1.005-1.032) (1.010-1.025)	<0,36
Coloração	4a (3-4) (3-4)	2b (1-2) (1-2)	<0,0001
Aspecto	3a (2-4) (3-3)	2b (1-3) (1-3)	<0,0001
Proteinúria (tiras reagentes)	3a (2-4) (2-4)	2b (1-4) (1-3)	<0,01
Sangue oculto (tiras reagentes)	2 (2-2) (2-2)	2 (2-2) (2-2)	<0,10
Células descamação no sedimento	2 (1-4) (1-2)	2 (1-4) (1-3)	<0,38
Grupos celulares no sedimento	1 (1-2) (1-2)	1 (1-2) (1-2)	<0,10
Hemácias no sedimento	3 (3-3) (3-3)	2 (2-3) (2-2)	<0,10
Leucócitos no sedimento	1 (1-2) (1-1,5)	1 (1-2) (1-1)	<0,12
Hemácias citologia	2 (2-2) (2-2)	2 (1-2) (1-2)	<0,10
Grupos celulares citologia	1 (1-2) (1-1,5)	1 (1-2) (1-1,5)	<0,10

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Hematologia de vacas Nelore, com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%).

Grupo	Gmacro	Gmicro	Valor de p
<b>Eritrócitos totais (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	4,9a (3,3-9,4) (4,2-5,8)	5,9b (4,9-8,4) (5,5-6,9)	<0,0001
<b>Hematócrito (%)</b>	24a (13-39) (21-29,5)	30b (25-42) (29-32,5)	<0,0003
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	7,3a (3,5-11,5) (6,3-8,8)	9,2b (7,1-12,9) (8,6-12,9)	<0,0004
<b>VCM (fL)</b>	47,4 (33,2-61) (42,9-51,5)	47,9 (39,8-57,5) (43,7-51,8)	<0,80
<b>CHCM (%)</b>	31,4 (28,9-33,4) (30,7-32,2)	31,3 (29,3-34) (30,4-32,3)	<0,68
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	318,5 (36-706) (217,3-421,5)	235,5 (52-533) (183,3-317,8)	<0,08
<b>PPT (g/dL)</b>	7,2a (6-9) (6,7-7,8)	7,8b (7,2-9,6) (7,6-8,4)	<0,0004
<b>Fibrinogênio (g/dL)</b>	0,2 (0-0,6) (0-0,4)	0,2 (0-0,6) (0,2-0,4)	<0,55

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

Tabela 3. Leucograma de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro) e com microhematúria (Gmicro). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%).

Grupo	Gmacro	Gmicro	Valor de p
<b>Leucócitos totais (/mm<sup>3</sup>)</b>	8.100a (3.100-16.300) (5.400-10.150)	10.500b (4.500-15.400) (9.100-13.100)	<0,0058
<b>Neutrófilos segmentados (/mm<sup>3</sup>)</b>	3.286a (930-10.595) (1.672-4.088)	4.680b (1.260-9.490) (3.285-5.640)	<0,0097
<b>Neutrófilos bastonetes (/mm<sup>3</sup>)</b>	0 (0-0) (0-0)	0 (0-60) (0-0)	<0,42
<b>Linfócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	3.953 (1.518-7.693) (2.407-5.474)	4.672 (2.340-9.548) (3.888-5.881)	<0,07
<b>Monócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	0 (0-608) (0-186,5)	90 (0-960) (0-245)	<0,57
<b>Eosinófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	736 (47-2.438) (350-1.108)	840 (324-1.752) (511-1.140)	<0,26
<b>Basófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	0 (0-0) (0-0)	0 (0-0) (0-0)	<0,10

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos e haptoglobina em vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro), com microhematúria (Gmicro) e bovinos saudáveis (Gc). Mediana (mínimo – máximo) e distribuição em percentis (25%-75%).

Grupo	Gmacro	Gmicro	Gc	Valor de p
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	7,1a (5,9-9,5) (6,7-7,7)	7,8b (5-9,3) (7,6-8,3)	6,5a (5,2-7,9) (5,5-7,2)	<0,004
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,1 (2,2-4,3) (2,9-3,3)	3,2 (2,2-3,7) (2,9-3,6)	3,2 (3,1-3,5) (3,1-3,5)	<0,31
<b>Globulinas (g/dL)</b>	3,9ab (2,9-6,8) (3,7-4,5)	4,6a (2,8-6,6) (3,9-5,2)	3,4b (2,1-4,8) (2,2-3,7)	<0,007
<b>Ureia (mg/dL)</b>	17,8 (8,8-43,1) (14,6-22,9)	17,7 (12,0-35,7) (14,9-26,3)	23,5 (10,2-45,7) (20,6-32,7)	<0,14
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,2 (0,5-2,8) (0,9-1,6)	1,3 (0,9-2,0) (1,2-1,5)	1,3 (0,9-1,7) (1,1-1,4)	<0,64
<b>AST (UI/L)</b>	95,1a (53,4-207,6) (70,2-102,4)	95,2a (60,4-146,9) (78,4-146,9)	25,5b (23,8-67,6) (24,2-63,1)	<0,0003
<b>GGT (UI/L)</b>	22,2 (12,4-60,3) (17,9-27,95)	25,4 (11,8-134,2) (18,3-33,9)	25,4 (23,3-27) (23,4-26,8)	<0,41
<b>Ck (UI/L)</b>	195,1a (73,5-935-9) (120,8-316)	152,5a (48,6-362,6) (121,4-235,4)	37,7b (26-94,7) (26-72,7)	<0,0004
<b>Haptoglobina (g/L)</b>	0,47a (0,26-1,56) (0,37-0,61)	0,58a (0,43-0,97) (0,46-0,73)	0,12b (0,02-0,18) (0,04-0,14)	<0,0001

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os grupos Gmacro e Gmicro foram compostos por animais oriundos de fazendas com histórico de HEB. Vinte e nove vacas tinham macrohematúria no momento da colheita. Aquelas que não apresentavam hematúria evidente, foram detectadas pela urinálise com microhematúria e constituíram o Gmicro (21 animais). A coloração amarelo clara ou escura, como as apresentadas pelos animais em Gmicro, dificultou e/ou impossibilitou a detecção da hematúria ao exame físico. Hopkins (1987) encontrou hematúria e proteinúria em 8% e 33%, respectivamente, das amostras de urina de bovinos aparentemente saudáveis, criados em região onde a hematúria enzoótica e a presença de *Pteridium* spp

nos pastos eram comuns. Sugeriu que esse achado poderia indicar um estado pré-clínico da HEB. No entanto, sabe-se da característica intermitente da hematúria em alguns animais (DÖBEREINER; TOKARNIA; CANELLA, 1967; FALBO *et al.*, 2005; TOKARNIA *et al.*, 2012) e que presença de sangue na urina nos casos de HEB dependem da origem das células neoplásicas (neoplasmas de tecido hemático ou mistos)(PEREZ-ALENZA *et al.*, 2006).

A presença de proteinúria foi demonstrada nos dois grupos, sendo maior em Gmacro ( $p < 0,05$ ). Perez-Alenza *et al.*(2006) obtiveram resultados semelhantes, tendo encontrado proteinúria, em diferentes intensidades, em 100% dos bovinos expostos cronicamente à samambaia. Sabe-se que leve proteinúria pode ocorre em bovinos saudáveis (KANTEK GARCIA-NAVARRO, 1996), mas na presença de sangue total, oriundo de alterações infecciosas ou inflamatórias, são causas comuns de proteinúria nos ruminantes (BOTELHO *et al.*, 2012).

Quanto à presença de hemácias, células inflamatórias e descamação epitelial no sedimento urinário, não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Esses achados são comuns, considerando as lesões neoplásicas, hiperplásicas e inflamatórias na vesícula urinária desses animais (PRICE; PAMUKCU, 1968; MEUTEN, 2016), e foram relatados por pesquisadores que avaliaram a urina de bovinos com HEB (SÁNCHEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2004; PEREZ-ALENZA *et al.*, 2006; AZEVEDO, 2013; FORTES *et al.*, 2016).

A análise do sedimento corado, a qual não foi diferente entre os grupos ( $p < 0,05$ ), não permitiu a identificação e diferenciação das células neoplásicas das demais. Porém contribuiu para a melhor visualização dos demais componentes do sedimento urinário. Segundo Raskin e Meyer (2011), a análise

do sedimento deve ser feita sem e com coloração na urinálise de rotina, para que a maioria dos elementos possam ser evidenciados. Azevedo (2013) ao avaliar amostras de citologia urinária de vacas com HEB obtidas por lavado vesical, também não encontrou células neoplásicas, e em 60% das amostras havia células inflamatórias.

As densidades urinárias em Gmacro e Gmicro, com mediana de 1,020 e 1,016, respectivamente, apresentaram-se um pouco abaixo dos valores de referência para a espécie, de 1,025– 1,045 (KANTEK GARCIA-NAVARRO, 1996). Esses resultados provavelmente não refletem alterações da função renal, uma vez que não foram encontrados cilindros na análise do sedimento urinário (KANTEK GARCIA-NAVARRO, 1996), nem alteração sérica dos valores de ureia e creatinina (RUSSELL; ROUSSEL, 2007; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008), cujos valores de referência para a espécie são, respectivamente,  $27,57 \pm 9,56$  e  $1,65 \pm 0,2$  (BARROS FILHO, 1995).

Os valores de referências para as principais variáveis analisadas no soro e sangue total dos bovinos foram há muito estabelecidas e consagradas por vários pesquisadores (GEORGE; SNIPES; LANE, 2010). No entanto, sabe-se que variações hematológicas e bioquímicas ocorrem em animais hígidos de acordo com fatores etários, raciais (FAGLIARI *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; AYRES *et al.*, 2001; BIRGEL JUNIOR *et al.*, 2001), estresse (JAIN, 1993), período pré-parto e estro nas fêmeas (HOLMAN, 1955), nutrição e manejo (BATISTA DA SILVA *et al.*, 2008), que devem ser considerados ao se avaliar um rebanho, distinguindo-as de alterações causadas por doenças. Dessa forma, os parâmetros hematológicos analisados nesse trabalho, foram comparados com valores de referência para bovinos adultos da raça Nelore, quando possível,

específicos para o sexo feminino, descritos por Barros Filho (1995), Fagliari *et al.* (1998), Costa *et al.* (2000) e Ayres *et al.* (2001).

A mediana das concentrações de eritrócitos, hematócrito e Hb não só diferiram entre os grupos ( $p < 0,05$ ), como estão abaixo dos valores de referência para bovinos da raça Nelore criados à pasto, descrito por Ayres *et al.* (2001), sendo eritrócitos  $8,83 \pm 1,4 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; hematócrito  $37,47 \pm 5,18\%$ ; Hb  $12,49 \pm 1,99 \text{ g/dL}$ . Essas alterações são comuns na perda de sangue total (WEISS; WARDROP, 2010), principal sinal clínico na HEB (PAMUKCU; GÖKSOY; PRICE, 1967; TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967), sendo a anemia proporcional à severidade da hematúria (SILVA *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Döbereiner, Tokarnia e Canella (1967), Sánchez-Villalobos *et al.* (2004), Gabriel *et al.* (2009), Silva *et al.* (2009) e Fortes *et al.* (2016). No entanto, Hopkins (1987) não encontrou redução significativa nos parâmetros do eritrograma e leucograma de bovinos com HEB quando comparados à indivíduos saudáveis.

O número de leucócitos totais e neutrófilos segmentados em Gmacro foram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) em relação a Gmicro. Quando comparados aos valores de referência estabelecidos por Costa *et al.* (2000) (leucócitos totais  $11835 \pm 1753/\text{mm}^3$ ; neutrófilos segmentados  $2914 \pm 1123/\text{mm}^3$ ; linfócitos  $7943 \pm 1501/\text{mm}^3$ ), os animais do presente estudo apresentam leucopenia e neutrofilia. Leucopenia em bovinos com HEB foi achado comum para Prasad (1983), XU (1992), Marçal (2003), Sanchez-Villalobos *et al.* (2004), Falbo *et al.* (2005) e Perez-Alenza *et al.* (2006).

Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na contagem de linfócitos entre os grupos do estudo. Porém, as vacas apresentam linfopenia se

comparadas aos valores de referência estabelecidos por Costa *et al.* (2000). Mesmo sem haver a inversão da relação L:N, houve uma mudança nas concentrações das mesmas. Segundo Schalm (1962), a inversão desse relação indica a presença de desordens inflamatórias. Respostas fisiológicas, como a do estresse crônico, levam ao aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos na circulação (JAIN, 1993). O fato de a HEB ser um doença crônica, intermitente e debilitante (TOKARNIA *et al.*, 2012), pode sustentar esse achado. As mesmas alterações no perfil leucocitário encontradas nesse estudo também foram relatadas por Prasad (1983). O pesquisador considerou que o estresse causado por distúrbios metabólicos, hemorragias e toxicoses poderiam causar neutrofilia, enquanto que doenças virais, estresse e radiação ionizante poderiam causar linfopenia.

Quanto à atividade das principais enzimas séricas, AST e Ck tiveram concentrações significativamente superior ( $p < 0,05$ ) nos dois grupos com HEB, quando comparado ao Gc e com valores de referência para a espécie bovina (AST  $30,99 \pm 5,1$  UI/L (BARROS FILHO, 1995); CK de 66 a 120 1UI/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008)). A elevação dessas duas proteínas simultaneamente é interpretada como lesão muscular, sendo a persistência dessa elevação relacionada à lesão muscular ativa (THRALL, 2007). Apesar de os bovinos com HEB apresentarem anemia, prostração, perda de peso e definhamento (PRICE; PAMUKCU, 1968; FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002), os animais do estudo apresentaram relativo bom estado geral no momento da colheita das amostras. No entanto, os resultados sugerem dano muscular.

As concentrações de PT foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais com microhematúria, quando comparados aos animais saudáveis. À



comparação com os valores de referência ( $6,95 \pm 0,7$  g/dL (FAGLIARI *et al.*, 1998)), os dois grupo com HEB apresentaram maiores teores de proteína sérica. A albumina sérica permaneceu dentro dos limites de normalidade ( $3,26 \pm 0,36$  g/dL (FAGLIARI *et al.*, 1998)) em todos os grupos. A mediana das globulinas foram maiores em Gmacro e Gmicro, em relação a Gce ao valor de referência para a espécie ( $3,69 \pm 0,4$  g/dL (FAGLIARI *et al.*, 1998)). Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada apenas entre os animais com microhematúria e os animais de Gc. Pela avaliação da relação albumina/globulina (BATISTA DA SILVA *et al.*, 2008), nota-se que nesse estudo o aumento da proteína sérica total ocorreu em detrimento do aumento das globulinas nos animais com HEB, também encontrada em outros estudos (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; PEREZ-ALENZA *et al.*, 2006).

O Fb, uma globulina com relevante papel como marcador da inflamação para a espécie bovina, não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Gmacro e Gmicro, permanecendo dentro dos valores de normalidade ( $0,34$  g/dL (BARROS FILHO, 1995)). No entanto, o aumento do Fb foi demonstrado na intoxicação por *Pteridium* spp. em resposta à trombocitopenia (MARÇAL *et al.*, 2002; MARÇAL, 2003; DE OLIVEIRA, 2009). Simplicio *et al.* (2013) demonstraram a diferença de responsividade de diferentes PFA, inclusive o fibrinogênio, em diferentes bovinos com doenças (mastite estafilocócicas, fotossensibilização e onfaloflebite). Apenas nos animais com onfaloflebite o Fb mostrou-se um bom indicador.

A concentração sérica da Hp apresentou significativa diferença entre os animais com HEB e os animais saudáveis ( $p < 0,05$ ), sendo o maior valor encontrado em Gmicro, demonstrando a presença de alterações sistêmicas no

animais com a doença. Esse resultado é acompanhado pelo aumento das concentrações séricas de globulinas nesses grupos. A mediana das concentrações séricas de Hp em Gc foi próxima ao valor de referência para a espécie ( $>0,1$  g/L, Ceciliani *et al.* (2012)), e foram superiores em Gmacro e Gmicro.

Suojala *et al.* (2008), ao induzirem consecutivamente mastite estafilocócicas em vacas, observaram aumentos séricos na concentração de Hp em 60 – 68 hora após a inoculação. As concentrações médias de Hp observadas no segundo desafio ( $1,13 \pm 0,08$  g/L) foram significativamente menores ( $p < 0,001$ ) do que no primeiro desafio ( $1,70 \pm 0,68$  g/L), acompanho os sinais clínicos também mais discreto. No presente estudo, observou-se maior aumento na concentração sérica de Hp em vacas com microhematúria.

Skinner, Brown e Roberts (1991) demonstraram que a Hp, em vacas leiteiras em condições de campo, foi capaz de diferenciar doenças não infecciosas e crônicas, de doenças infecciosas. Enquanto vacas saudáveis e com endometrite crônica tiveram concentrações séricas médias de Hp de  $0,012 \pm 0,005$  e  $0,030 \pm 0,018$  g/L, respectivamente, nas vacas com doenças inflamatórias as concentrações foram  $\geq 0,76 \pm 0,14$  g/L. A HEB, apesar de ser uma doença crônica, apresenta sinais clínicos contínuos e intermitentes, além de períodos de remissão e reagudização da doença serem comuns, sendo acompanhados por variações do estado geral do animal (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; TOKARNIA *et al.*, 2012).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, a Hp mostrou-se sensível na diferenciação de vacas Nelore saudáveis, daquelas com HEB ( $p<0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas, em relação à concentração de Hp, entre os animais com macrohematúria e microhematúria. Hiperglobulinemia e aumento da proteína sérica total também foram achados significativos nos animais com HEB ( $p<0,05$ ). O aumento da atividade das proteínas séricas AST e CK sugere dano muscular nesses animais. A contagem de eritrócitos, o hematócrito, concentração de hemoglobina foram significativamente menores em Gmacro ( $p<0,05$ ) em relação à Gmicro, provavelmente por causa da intensidade da hematúria. A redução na contagem total de leucócitos e aumento no número de neutrófilos em Gmacro também foram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) em relação a Gmicro.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

AYRES, M. C. C. et al. Avaliação da influência de fatores relacionados ao sexo sobre a variabilidade do eritrograma de zebuínos (*Bos indicus* , Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 2, p. 31–36, 2001.

AZEVEDO, M. A. SI. **Avaliação citopatológica, imunocitoquímico e teste do cometa do lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

BARROS FILHO, I. R. **Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em zebuínos da raça Nelore criados no estado de São Paulo: Influência dos fatores etários e do tipo racial**. [s.l.] Curso de Pós-graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo, 1995.

BATISTA DA SILVA, E. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2191–2196, 2008.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1–9, 2001.

BOTELHO, G. G. et al. Relação proteína/creatinina urinária (PU/CrU) em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 121–126, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de

Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. In: **Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal no Brasil**. 1. ed. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. p. 440.

COSTA, J. N. et al. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 399–403, 2000.

DE OLIVEIRA, L. G. P. **NOVOS ASPECTOS PATOLÓGICOS E PATOGENÉTICOS DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA**. [s.l: s.n.].

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência Da Hematúria Enzoótica E De Carcinomas Epidermóides No Trato Digestivo Superior Em Bovinos No Brasil . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 489–504, 1967.

ECKERSALL, P. D. et al. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. **Comparative Haematology International**, v. 9, n. 3, p. 117–124, 1999.

FAGLIARI, J. J. et al. Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 263–271, 1998.

FALBO, M. K. et al. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* ( L .) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 547–558, 2005.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) -Toxic Effects and Toxic Constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 46, n. 1, p. 147–

173, 1988.

FORTES, M. S. et al. Avaliações hematológicas, bioquímicas e de urinálise, em fêmeas Nelore, originadas de propriedades rurais com e sem a presença de samambaia (*Pteridium arachnoideum*) nas pastagens. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 7, p. 542–549, 2016.

FRANÇA, T. DO N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 85–96, 2002.

GABRIEL, A. L. et al. Aspectos clínico-patológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 515–525, 2009.

GEORGE, J. W.; SNIPES, J.; LANE, V. M. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 138–148, 2010.

GROXCO, R. B. et al. Prevalence of bovine enzootic hematuria in the municipalities of Adrianópolis, PR and Ribeira, SP - Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 4, 2017.

HOLMAN, H. H. The Blood Picture of the Cow. **British Veterinary Journal**, v. 111, n. 10, p. 440–457, 1955.

HOPKINS, N. C. G. Enzootic haematuria in nepal. **Tropical Animal Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 159–164, 1987.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KANEKO, J. J.; SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **California Veterinarian**, v. 21, n. 4, p. 21–24, 1964.

KANTEK GARCIA-NAVARRO, C. E. **Manual de urinálise**. São Paulo: Varela, 1996.

KRAFTS, K.; PAMBUCCIAN, S. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 2, p. 82–93, 14 abr. 2011.

MARÇAL, W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Aberdeen Angus. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 77–81, 2002.

MARÇAL, W. S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1998, p. 197–208, 2003.

MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames, IA, United States: Iowa State University Press, 2016.

PAMUKCU, A. M.; GÖKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary Bladder Neoplasms Induced by Feeding Bracken Fern (*Pteris aquilina*) to Cows. **Cancer Research**, v. 27, n. MAY, p. 917–924, 1967.

PEREZ-ALENZA, M. D. et al. Clinico-pathological findings in cattle exposed to chronic bracken fern toxicity. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 4, p.

185–192, 2006.

PRASAD, M. C. Haematological and biochemical alterations in enzootic bovine haematuria. **Acta Veterinaria Brno**, v. 52, p. 157–161, 1983.

PRICE, J. M.; PAMUKCU, A. M. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2247–2251, 1968.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos: Atlas colorido e guia de interpretação**. 2. ed. São Paulo: Elsevier Medicina Brasil – Grupo Elsevier, 2011.

RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403–426, 2007.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A. et al. Observaciones Clínico Patológicas En Vacas Con Hematuria Enzoótica Bovina. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. XIV, n. 4, p. 317–323, 2004.

SCHALM, O. W. Leukocyte responses to disease in various domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 140, p. 557–563, 1962.

SILVA, M. A. DA et al. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1847–1850, 2009.

SIMPLÍCIO, K. M. M. G. et al. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**



**Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1339–1347, 2013.

SKINNER, J. G.; BROWN, R. A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **The Veterinary record**, v. 128, n. 7, p. 147–9, 1991.

SUOJALA, L. et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2008.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 329–336, 1967.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

XU, L. R. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 1, p. 116–121, 1992.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 798–813, 2007.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos estudos considerados na revisão bibliográfica apresentada, a maior parte avaliou o comportamento da Hp em bovinos com aptidão leiteira, ou em condições ambientais extremamente diferentes da qual são mantidos os bovinos de corte criados extensivamente no Brasil. Batista da Silva *et al.* (2008) demonstraram significativa diferença dos parâmetros leucocitários e bioquímicos entre bovinos Nelore confinados e em criação extensiva, onde o maior desafio enfrentado pelos animais à campo pareceu influenciar nos parâmetros laboratoriais de bovinos considerados saudáveis.

Como a atividade das citocinas pró-inflamatórias é dinâmica (OHTSUKA *et al.*, 2001) e como a resposta de cada PFA varia individualmente de acordo com esses estímulos (CECILIANI *et al.*, 2012), sugere-se mais estudos da Hp na HEB, além da pesquisa da dinâmica de outras PFA nessa doença e em outras doenças em bovinos da raça Nelore.

## REFERÊNCIAS

ABERNETHY, T. J.; AVERY, O. T. the Occurrence During Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood I. Distribution of the Reactive Protein in Patients' Sera and the Effect of Calcium on the Flocculation Reaction With C Polysaccharide of Pneumococcus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 73, n. 2, p. 173–82, 1941.

ALLISON, A. C.; REES, W. The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobins) - its bearing on the "renal threshold" for haemoglobin and the aetiology of haemoglobinuria. **British Medical Journal**, v. 2, n. Nov. 16, p. 1137–1143, 1957.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. **Le Lait**, v. 78, n. 4, p. 413–423, 1998.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 549–553, 2001.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 6, p. 675–86, 2002.

ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; DE JONGH, F. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. **Le Lait**, v. 73, n. 3, p. 323–332, 1993.

ALONSO-AMELOT, M. E.; RODULFO-BAECHLER, S.; JAIMES-ESPINOZA, R. Comparative dynamics of ptaquiloside and pterosin B in the two varieties

(caudatum and arachnoideum) of neotropical Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 7–8, p. 709–716, nov. 1995.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: An epidemiologic study. **International Journal of Cancer**, v. 91, n. 2, p. 252–259, 2001.

ALSEMGEEEST, S. P. M. et al. Concentrations of serum Amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 21–23, 1994.

ANJOS, B. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 501–507, 2008.

ARANHA, P. C. R. et al. Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. **Journal of Chromatography. B**, v. 951–952, p. 44–51, 1 mar. 2014.

AYRES, M. C. C. et al. Avaliação da influência de fatores relacionados ao sexo sobre a variabilidade do eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 2, p. 31–36, 2001.

AZEVEDO, M. A. SI. **Avaliação citopatológica, imunocitoquímico e teste do cometa do lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

BARROS FILHO, I. R. **Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em**

**zebuínos da raça Nelore criados no estado de São Paulo: Influência dos fatores etários e do tipo racial.** [s.l.] Curso de Pós-graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo, 1995.

BATISTA DA SILVA, E. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2191–2196, 2008.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1740–1750, 2007.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1–9, 2001.

BOTELHO, G. G. et al. Relação proteína/creatinina urinária (PU/CrU) em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 121–126, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. In: **Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal no Brasil**. 1. ed. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. p. 440.

BRAUN, J. P. et al. Gamma Glutamyl Transferase in domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 6, n. 1, p. 77–90, 1983.

BREMNER, K. C. Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle.

**The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 42, p. 643–656, 1964.

CAMPO, M. S. Bovine Papillomavirus and Cancer. **The Veterinary journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.

CARDOSO, N. *Pteridium catalensis* sp. nov., uma nova pteridófito fóssil do complexo carbinalítico Catalão I, Goiás. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v. 9, n. 3, p. 303–310, 2006.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 336–346, 2006.

CEBRA, C. K. et al. Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 231–237, 1997.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207–4231, 2012.

CLARK, R. G. et al. The ability of biochemical and haematological tests to predict recovery in periparturient recumbent cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, n. 8, p. 126–133, 1987.

CONCEIÇÃO, W. L. F. **Perfil bioquímico sérico de vacas das raças nelore e Girolanda sororreagentes ou não à brucelose e leptospirose no estado do Maranhão - Brasil**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP, Campus de Jaboticabal, 2010.

COQUILLAT, M. Au sujet du “ pain de fougère ” en Maconnais. **Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon**, v. 19, p. 173–176, 1950.

COSTA, J. N. et al. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 399–403, 2000.

CURIAL, O. **Hematúria Enzoótica dos Bovinos. Observações Anatomopatológicas. Tese de Mestrado.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 1964.

DE OLIVEIRA, L. G. P. **NOVOS ASPECTOS PATOLÓGICOS E PATOGENÉTICOS DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.** [s.l.: s.n.].

DE SILVA, Ú. S. R.; MATOS, D. M. DA S. The invasion of *Pteridium aquilinum* and the impoverishment of the seed bank in fire prone areas of Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 9, p. 3035–3043, 2006.

DER, J. P. et al. Global Chloroplast Phylogeny and Biogeography of Bracken (*Pteridium* ; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência Da Hematúria Enzoótica E De Carcinomas Epidermóides No Trato Digestivo Superior Em Bovinos No Brasil . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 489–504, 1967.

EATON, J. W. et al. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, v. 215, n. 4533, p. 691–3, 1982.

ECKERSALL, P. D. et al. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. **Comparative Haematology**

**International**, v. 9, n. 3, p. 117–124, 1999.

ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v. 148, n. 2, p. 35–41, 2001.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 12, p. 169–178, 1988.

EVANS, I. A. The radiomimetic nature of bracken toxin. **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2252–2261, 1968.

EVANS, I. A. Relationship between bracken and cancer. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 73, n. 1, p. 105–112, 1976.

FAGLIARI, J. J. et al. Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 263–271, 1998.

FAGLIARI, J. J. et al. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 383–387, 2003.

FAGLIARI, J. J. et al. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1355–1358, 2007.

FALBO, M. K. et al. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 547–558, 2005.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) -Toxic Effects and Toxic



Constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 46, n. 1, p. 147–173, 1988.

FORTES, M. S. et al. Avaliações hematológicas, bioquímicas e de urinálise, em fêmeas Nelore, originadas de propriedades rurais com e sem a presença de samambaia (*Pteridium arachnoideum*) nas pastagens. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 7, p. 542–549, 2016.

FRANÇA, T. DO N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 85–96, 2002.

FURLAN, F. H. et al. Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematúria enzoótica bovina 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 753–759, 2014.

GABRIEL, A. L. et al. Aspectos clínico-patológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 515–525, 2009.

GALVÃO, A. et al. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 887–902, 2012.

GEORGE, J. W.; SNIPES, J.; LANE, V. M. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 138–148, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil Sangüíneo: Ferramenta De

Análise Clínica, Metabólica E Nutricional. In: GONZÁLEZ, F. .; CAMPOS, R. (Eds.). . **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 73–89.

GREGORY, L. et al. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 339–345, 2004.

GROXCO, R. B. et al. Prevalence of bovine enzootic hematuria in the municipalities of Adrianópolis, PR and Ribeira, SP - Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 4, 2017.

HADWEN, S. Bovine hæmaturia. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 31, p. 64–70, 1918.

HEEGAARD, P. M. H. et al. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1–2, p. 151–159, 2000.

HIRONO, I. et al. Studies on Carcinogenic Properties of Bracken, *Pteridium aquilinum*. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 45, n. 1, p. 179–188, 1970.

HIRONO, I. et al. Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. **Cancer Letters**, v. 21, n. 3, p. 239–246, 1984a.

HIRONO, I. et al. Carcinogenicity in Rats of Ptaquiloside Isolated from Bracken.

**Gann**, v. 75, n. 10, p. 833–836, 1984b.

HIRONO, I. et al. Reproduction of Progressive Retinal Degeneration (Bright Blindness) in Sheep by Administration of Ptaquiloside Contained Bracken. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 6, p. 979–983, 1993.

HÖFNER, M. C. et al. Haptoglobin response of cattle infected with foot-and-mouth disease virus. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 1, p. 125–128, 1994.

HOLMAN, H. H. The Blood Picture of the Cow. **British Veterinary Journal**, v. 111, n. 10, p. 440–457, 1955.

HOPKINS, N. C. G. Enzootic haematuria in nepal. **Tropical Animal Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 159–164, 1987.

HORADAGODA, A. et al. Immediate responses in serum TNF alpha and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. **Research in veterinary science**, v. 57, n. 1, p. 129–132, 1994.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437–441, 1999.

HUZZEY, J. M. et al. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 621–625, 2009.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 377–402, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KANEKO, J. J.; SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **California Veterinarian**, v. 21, n. 4, p. 21–24, 1964.

KANTEK GARCIA-NAVARRO, C. E. **Manual de urinálise**. São Paulo: Varela, 1996.

KRAFTS, K.; PAMBUCCIAN, S. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 2, p. 82–93, 14 abr. 2011.

KRAUSS, S.; SARCIONE, E. J. Role of the Liver in the Catabolism of Serum Haptoglobin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 122, n. 31514, p. 1019–1022, 1966.

LE DUC, M. G.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Changes in the rhizome system of bracken subjected long-term experimental treatment. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, n. 3, p. 508–522, 2003.

MACKIEWICZ, A. Acute phase proteins and transformed cells. **International Review of Cytology**, v. 170, n. 0074–7696, p. 225–300, 1997.

MADEJA, J. et al. Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), Mistletoe (*Viscum album* (L.)) and Bladder-nut (*Staphylea pinnata* (L.))-Mysterious Plants with Unusual Applications. Cultural and Ethnobotanical Studies. **Plants and cultural: seeds of the cultural heritage of Europe**, p. 207–215, 2009.

MARÇAL, W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Aberdeen Angus. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 77–81, 2002.

MARÇAL, W. S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1998, p. 197–208, 2003.

MARLIÉRE, C. A. et al. Ingestão de broto de samambaia e risco de câncer de esôfago e estômago na região de Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 44, n. 3, p. 225–229, 1998.

MATOKA, M. et al. Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, v. 2, n. 6, p. 419–423, 1987.

MATSUOKA, A. et al. Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes - II. Chromosomal aberration test with cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 215, n. 2, p. 179–185, dez. 1989.

MCKENZIE, R. A. Bovine enzootic haematuria in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 61–4, 1978.

MELAMED-FRANK, M. et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3693–8, 2001.

MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames, IA, United States: Iowa State University Press, 2016.

MILLER, L. L. et al. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 94, p. 431–453, 1951.

MOREIRA SOUTO, M. A. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*).

**Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 112–122, 2006.

MORI, H. et al. Genotoxicity of ptaquiloside, a bracken carcinogen, in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. **Mutation Research**, v. 143, p. 75–78, 1985.

MORIMATSU, M. et al. Bovine haptoglobin: Single radial immunodiffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute-phase sera. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 33, n. 4, p. 365–372, 1992.

NAGAO, T. et al. Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes - I. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, v. 215, n. 2, p. 173–178, dez. 1989.

NEUHAUS, O. W.; SOGOIAN, V. Presence of Haptoglobin in Synovial Fluid. **Nature**, v. 192, n. Nov. 11, p. 558–559, 1961.

NIWA, H. et al. Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 48, p. 5371–5372, 1983.

OHTSUKA, H. et al. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **The Journal of veterinary medical science**, v. 63, n. 6, p. 675–678, 2001.

OJIKI, M. et al. Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*: structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino acids, nucleosides, and

nucleotides. **Tetrahedron**, v. 43, n. 22, p. 5261–5274, 1987.

OJIKI, M. et al. Modification and cleavage of DNA by ptaquiloside. A new potent carcinogen isolated from bracken fern. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 22, p. 1775–1777, 1989.

ÖZKUL, I. A.; AYDIN, Y. Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 4, p. 473–475, 1996.

PAES, P. R. DE O. et al. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 305–312, 2012.

PAGE, C. N. The taxonomy and phytogeography of bracken - a review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 73, n. 1–3, p. 1–34, 1976.

PAMUKCU, A. M. Tumors of the Urinary Bladder in Cattle and Water Buffalo Affected with Enzootic Bovine Hematuria. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 4, n. 2, p. 185–197, 1957.

PAMUKCU, A. M. Epidemiologic Studies on Urinary Bladder Tumors in Turkish Cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 938–947, 1963.

PAMUKCU, A. M. et al. Quercetin, a Rat Intestinal and Bladder Carcinogen Present in Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p. 3468–3472, 1980.

PAMUKCU, A. M.; GÖKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary Bladder Neoplasms Induced by Feeding Bracken Fern (*Pteris aquilina*) to Cows. **Cancer Research**,

v. 27, n. MAY, p. 917–924, 1967.

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. T. Naturally Occurring and Bracken-Fern-Induced Bovine Urinary Bladder Tumors: Clinical and Morphological Characteristics. **Veterinary Pathology Online**, v. 13, p. 110–122, 1976.

PEREZ-ALENZA, M. D. et al. Clinico-pathological findings in cattle exposed to chronic bracken fern toxicity. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 4, p. 185–192, 2006.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163–187, mar. 2004.

PRAKASH, A. S. et al. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural toxins**, v. 4, n. 5, p. 221–7, 1996.

PRASAD, M. C. Haematological and biochemical alterations in enzootic bovine haematuria. **Acta Veterinaria Brno**, v. 52, p. 157–161, 1983.

PRICE, J. M.; PAMUKCU, A. M. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2247–2251, 1968.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos: Atlas colorido e guia de interpretação**. 2. ed. São Paulo: Elsevier Medicina Brasil – Grupo Elsevier, 2011.

RECOUSO, R. et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary



data. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 22–29, 2003.

ROOS, K. et al. Growth of Tropical Bracken (*Pteridium arachnoideum*): Response to Weather Variations and Burning. **Invasive Plant Science and Management**, v. 3, n. 4, p. 402–411, 2010.

RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403–426, 2007.

SAITO, K. et al. Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of *pteridium aquilinum*, and the distribution of related compounds in the *pteridaceae*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1605–1611, jan. 1989.

SAITO, K. et al. The sesquiterpenoid carcinogen of bracken fern, and some analogues, from the *pteridaceae*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1475–1479, 1990.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A. et al. Observaciones Clínico Patológicas En Vacas Con Hematuria Enzoótica Bovina. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. XIV, n. 4, p. 317–323, 2004.

SCHALM, O. W. Leukocyte responses to disease in various domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 140, p. 557–563, 1962.

SCHMIDT, B. et al. Genotoxic activity and inhibition of soil respiration by ptaquiloside, a bracken fern carcinogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 2751–2756, 2005.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in**

**Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 269–271, 2013.

SHAHIN, M. et al. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 244, n. 1, p. 192–7, 6 mar. 1998a.

SHAHIN, M. et al. H-ras activation is an early event in the ptaquiloside-induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 250, n. 2, p. 491–7, 18 set. 1998b.

SHAHIN, M.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in the human diet. **Mutation Research**, v. 443, n. 1–2, p. 69–79, 1999.

SILVA, M. A. DA et al. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1847–1850, 2009.

SILVA MATOS, D.; BELINATO, T. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, maio 2010.

SIMPLÍCIO, K. M. M. G. et al. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1339–1347, 2013.

SKINNER, J. G.; BROWN, R. A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **The Veterinary record**, v. 128, n. 7, p. 147–9,

1991.

SMITH, B. L.; BEATSON, N. S. Bovine Enzootic Haematuria in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 18, p. 115–120, 1970.

SNOW, C. S. R.; MARRS, R. H. Restoration of Calluna heathland on a bracken Pteridium - infested site in north west England. **Biological Conservation**, v. 81, n. 1–2, p. 35–42, 1997.

SOUZA, M. V.; GRAÇA, D. L. Intoxicação crônica por Pteridium aquilinum (L.) Kuhn (Polypodiaceae) em bovinos. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 203–207, 1993.

SUNDERMAN, F. M. Bracken poisoning in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 1, p. 25–26, 1987.

SUOJALA, L. et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced E. coli intramammary infections in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2008.

SUTTON, R. H.; HOBMAN, B. The value of plasma fibrinogen estimations in cattle: A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, n. 3, p. 21–27, 1975.

THOMAS, B.; WALKER, H. F. The inactivation of thiamin by bracken (Pteris aquilina). **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 68, p. 6–9, 1949.

THOMSON, J. A. Towards a taxonomic revision of Pteridium (Dennstaedtiaceae). **Telopea**, v. 10, n. 4, p. 793–803, 2004.

THOMSON, J. A.; MICKEL, J. T.; MEHLTRETER, K. Taxonomic status and relationships of bracken ferns ( Pteridium : Dennstaedtiaceae ) of Laurasian affinity in Central and North America. **Botanical Journal of the Linnean**

**Society**, v. 157, p. 1–17, 2008.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 329–336, 1967.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência Da Hematuria Enzoótica e de Carcinomas Epidermóides no Trato Digestivo Superior em Bovinos no Brasil . II. Estudos Complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 209–224, 1969.

ULUTAS, B. et al. Haptoglobin and Serum Amyloid A Responses in Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p. 1–6, 2011.

WANG, C. Y. et al. Identification of Carcinogenic Tannin Isolated From Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 1, p. 33–36, 1976.

WATT, A. S. Contributions to the ecology of bracken (*Pteridium aquilinum*). I. The Rhizome. **New Phytologist**, v. 39, n. 4, p. 401–422, 1940.

WEISS, D. J.; PERMAN, V. Assessment of the Hematopoietic System In Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 8, n. 2, p. 411–428, jul. 1992.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

WESWIG, P. H.; FREED, A. M.; HAAG, J. R. Antithiamine activity of plant materials. **Journal of Biological Chemistry**, v. 165, p. 737–738, 1946.

XU, L. R. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 1, p. 116–121, 1992.

YAMADA, K.; OJIKA, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 798–813, 2007.

SUPLEMENTOS

Tabela 5. Urinálise de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro): exame físico: densidade urinária, coloração e aspecto; exame químico (tiras reagentes): proteinúria e sangue oculto; sedimentoscopia: hemácias, leucócitos, células de descamação e agrupamentos celulares; citologia: hemácias e agrupamentos celulares. Escores estabelecidos para as análises: coloração (1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho); aspecto (1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo; 4= presença de coágulo); proteinúria e sangue oculto (1= negativo; 2= positivo). No sedimento: hemácias (1= ausência (<6/CMA); 2= presença (>7/CMA); 3= abundante (>100/CMA)), leucócitos (1= negativo (<3/CMA); 2= positivo (>4/CMA)), células de descamação epitelial (1= ausência (0/CMA); 2= ocasional (<2/CMA), 3= moderado (>3/CMA), 4= abundante (>5/CMA)), e grupamentos celulares (1= ausência; 2= presença). Na citologia: hemácias (1= ausência (<6/CMA); 2= presença (>7/CMA)) e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).

Animal	Exame físico			Exame químico			Sedimentoscopia			Citologia		
	Densidade	Coloração	Aspecto	Proteinúria	Sangue oculto	Sangue	Células de descamação	Grupos celulares	Hemácias	Leucócitos	Hemácias	Grupos celulares
1	1,02	4	3	4	2	2	2	1	3	1	2	1
2	1,02	4	3	4	2	2	1	1	3	1	2	1
3	1,032	4	3	4	2	2	1	1	3	1	2	1
4	1,03	4	3	4	2	2	1	1	3	1	2	1
5	1,028	4	3	3	2	2	2	1	3	1	2	1
6	1,018	3	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1
7	1,026	3	3	3	2	2	2	1	3	1	2	1
8	1,007	3	3	2	2	2	1	2	3	1	2	1
9	1,023	3	3	3	2	2	3	1	3	1	2	1
10	1,012	4	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1
11	1,026	4	4	4	2	2	2	1	3	1	2	1
12	1,016	4	3	2	2	2	2	2	3	1	2	1
13	1,018	3	3	3	2	2	2	1	3	1	2	1
14	1,022	4	3	3	2	2	2	1	3	2	2	1
15	1,018	3	2	2	2	2	1	1	3	1	2	1
16	1,022	3	3	3	2	2	2	2	3	1	2	2
17	1,03	4	3	4	2	2	1	1	3	2	2	1
18	1,012	4	3	2	2	2	3	2	3	2	2	1
19	1,014	4	3	4	2	2	2	1	3	2	2	2
20	1,008	3	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1
21	1,012	4	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2
22	1,01	4	3	4	2	2	1	2	3	2	2	2
23	1,026	4	3	4	2	2	3	2	3	1	2	2

24	1,03	4	3	4	2	2	4	2	3	1	2	2
25	1,02	4	3	2	2	2	4	2	3	1	2	2
26	1,005	4	3	2	2	2	1	1	3	1	2	1
27	1,03	4	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1
28	1,008	4	3	2	2	2	2	1	3	1	2	1
29	1,015	4	3	2	2	2	2	1	3	2	2	1
Mediana	1,02	4	3	3	2	2	2	1	3	1	2	1
Mínimo- Máximo	1,005- 1,032	3-4	2-4	2-4	2-2	2-2	1-4	1-2	3-3	1-2	2-2	1-2
Distribuição percentis (25%-75%)	1,012- 1,026	3-4	3-3	2-4	2-2	2-2	1-2	1-2	3-3	1-1,5	2-2	1-1,5

Tabela 2. Urinálise de vacas Nelore com microhematúria (Gmicro): exame físico: densidade urinária, coloração e aspecto; exame químico (tiras reagentes): proteinúria e sangue oculto; sedimentoscopia: hemácias, leucócitos, células de descamação e agrupamentos celulares; citologia: hemácias e agrupamentos celulares. Escores estabelecidos para as análises: coloração (1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho); aspecto (1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo; 4= presença de coágulo); proteinúria e sangue oculto (1= negativo; 2= positivo). No sedimento: hemácias (1= ausência ( $\leq$ 6/CMA); 2= presença ( $\geq$ 7/CMA); 3= abundante ( $\geq$ 100/CMA)), leucócitos (1= negativo ( $\leq$ 3/CMA); 2= positivo ( $\geq$ 4/CMA)), células de descamação epitelial (1= ausência (0/CMA); 2= ocasional ( $\leq$ 2/CMA), 3= moderado ( $\geq$ 3/CMA), 4= abundante ( $\geq$ 5/CMA)), e grupamentos celulares (1= ausência; 2= presença). Na citologia: hemácias (1= ausência ( $\leq$ 6/CMA); 2= presença ( $\geq$ 7/CMA)) e agrupamentos celulares (1= ausência; 2= presença).

Animal	Exame físico			Exame químico			Sedimentoscopia		Citologia		
	Densidade	Coloração	Aspecto	Proteinúria	Sangue oculto	Células de descamação	Grupos celulares	Hemácias	Leucócitos	Hemácias	Grupos celulares
1	1,026	2	3	2	2	3	1	3	1	2	1
2	1,008	2	3	1	2	4	2	3	1	2	2
3	1,032	2	3	3	2	1	1	2	1	2	1
4	1,025	2	3	2	2	1	1	2	1	1	1
5	1,014	2	3	2	2	1	1	2	1	2	1
6	1,028	1	1	3	2	3	2	2	1	1	2
7	1,024	1	1	2	2	3	1	2	1	2	1
8	1,01	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2
9	1,008	1	2	1	2	3	1	2	1	2	2
10	1,016	2	2	4	2	1	1	2	1	2	1
11	1,024	1	2	2	2	4	1	2	1	2	1
12	1,006	2	2	4	2	3	2	2	2	2	2
13	1,012	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1
14	1,01	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
15	1,028	1	1	4	2	1	1	2	1	1	1
16	1,02	1	3	4	2	4	2	2	1	2	1
17	1,016	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1
18	1,014	2	3	1	2	2	1	2	1	1	1
19	1,005	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1
20	1,01	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1
21	1,025	2	3	2	2	2	1	2	1	1	1
Mediana	1,016	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
Mínimo-Máximo	1,005-1,032	1-2	1-3	1-4	2-2	1-4	1-2	2-3	1-2	1-2	1-2
Distribuição percentis (25%-75%)	1,010-1,025	1-2	1-3	1-3	2-2	1-3	1-2	2-2	1-1	1-1,5	1,15



Tabela 3. Hematologia de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro). Contagem de eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), hematócrito (%), concentração de hemoglobina (g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM, %), plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), proteína plasmática total (PPT, g/dL) e fibrinogênio (g/dL).

Animal	Eritrócitos	Hematócrito	Hemoglobina	VCM	CHCM	Plaquetas	PPT	Fibrinogênio
1	3,91	18	5	41,3	31	0	6,4	0,2
2	3,42	13	3,5	33,2	30,9	706	6	0,2
3	5	25	7,3	43,7	33,4	202	7	0,6
4	5,03	21	7,5	47,7	31,3	268	6,6	0
5	5,47	24	7,2	39,6	33,3	268	6,4	0,6
6	9,42	39	11,5	37,7	32,3	217	8,2	0
7	4,9	21	6	38	32,2	372	7	0
8	4,83	24	7,6	48,6	32,4	298	7	0,2
9	6,56	31	8,7	42,6	31,1	221	8,4	0,4
10	5,06	25	7,1	44,8	31,4	456	7,8	0,6
11	3,28	15	4,7	45,4	31,7	515	6	0,2
12	4,87	22	6,4	41,9	31,3	424	7,4	0,2
13	3,7	22	6,3	51,4	33,1	372	8,2	0,4
14	6	30	9,3	49,2	31,5	187	7,4	0,4
15	5,7	32	10,3	61	30,3	36	8,4	0,2
16	5,24	28	8,3	51,5	30,8	365	8	0,4
17	5,1	28	7,8	51,8	29,5	296	7,2	0,2
18	6,57	32	9,8	46,8	31,9	207	7,2	0,2
19	5,92	28	8,6	44,4	32,8	197	7,8	0,2
20	6,43	34	9,8	47,4	32,2	218	6,6	0
21	4,24	21	6,5	50,2	30,6	414	6,8	0
22	4,81	22	6,6	43,7	31,4	339	9	0,6
23	3,41	19	5,3	53,9	28,9	612	7	0,4
24	4,23	21	6,3	50,4	30,5	468	7,2	0,2
25	4,17	18	5,7	43,3	31,6	394	6,2	0
26	4,97	29	8,9	56,3	31,8	194	7,6	0
27	4,2	19	7,5	59,6	30	628	7,4	0
28	4,01	25	7,2	58,1	31	296	7	0
29	6,26	33	9,7	50,5	30,6	349	7,2	0
Mediana	4,9	24	7,3	47,4	31,4	318,5	7,2	0,2
Mínimo-Máximo	3,3-9,4	13-39	3,5-11,5	33,2-61	28,9-33,4	36-706	6-9	0-0,6
Distribuição percentis (25%-75%)	4,2-5,8	21-29,5	6,3-8,8	42,9-51,5	30,7-32,2	217,3-421,5	6,7-7,8	0-0,4

Tabela 4. Hematologia de vacas Nelore com microhematúria (Gmicro). Contagem de eritrócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>), hematócrito (%), concentração de hemoglobina (g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM, %), plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL), proteína plasmática total (PPT, g/dL) e fibrinogênio (g/dL).

Animal	Eritrócitos	Hematócrito	Hemoglobina	VCM	CHCM	Plaquetas	PPT	Fibrinogênio
1	5,51	29	8,2	45,8	32,5	0	8	0
2	5,5	27	8	47,9	30,4	314	8,8	0,6
3	5,45	29	8,9	52,7	31	227	8,6	0
4	4,98	25	7,1	44,7	31,9	458	9,6	0,2
5	6,5	31	9,2	45	31,5	277	8,8	0,6
6	5,55	30	9,1	53,8	30,5	231	7,8	0,6
7	5,71	30	9,4	51,2	32,1	176	7,8	0,4
8	8,4	42	12,9	48,8	31,5	75	7,6	0,2
9	5,69	29	9,1	52,4	30,5	319	8	0,2
10	6,77	32	9	42,4	31,3	205	7,2	0,2
11	6,42	29	8,9	44,7	31,1	236	8,8	0,4
12	5,96	31	9,4	52,9	29,8	165	7,8	0,2
13	7,06	29	10,7	47,9	31,6	270	8,2	0,2
14	7,74	36	10,8	42,6	32,8	160	7,6	0
15	4,95	27	7,6	50,8	30,2	533	7,8	0,2
16	8,14	38	11,6	39,8	34	256	7,8	0
17	7,11	36	10,4	48	30,4	235	7,2	0,2
18	6,9	32	9,2	41	32,6	319	8	0,2
19	6,8	30	9,4	41,6	33,3	216	7,4	0,4
20	5,49	33	9,4	57,5	29,8	52	8	0,2
21	5,08	27	7,2	48,4	29,3	528	7,4	0,2
Mediana	5,9	30	9,2	47,9	31,3	235,5	7,8	0,2
Mínimo-Máximo	4,9-8,4	25-42	7,1-12,9	39,8-57,5	29,3-34	52-533	7,2-9,6	0-0,6
Distribuição percentis (25%-75%)	5,5-6,9	29-32,5	8,6-12,9	43,7-51,8	30,4-32,3	183,3-317,8	7,6-8,4	0,2-0,4

Tabela 5. Leucograma de vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro). Contagem de leucócitos totais (Leuc. totais, céls./mm<sup>3</sup>), neutrófilos segmentados (Neut. seg., céls./mm<sup>3</sup>), neutrófilos bastonete (Neut. bast., céls./mm<sup>3</sup>), linfócitos (céls./mm<sup>3</sup>), monócitos (céls./mm<sup>3</sup>), eosinófilos (céls./mm<sup>3</sup>) e basófilos (céls./mm<sup>3</sup>).

Animal	Leuc. totais	Neut. seg.	Neut. bast.	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
1	7300	3358	0	3431	146	365	0
2	4300	1204	0	2537	0	516	0
3	12000	4080	0	6360	600	960	0
4	6700	3015	0	3350	0	335	0
5	6800	3400	0	2448	0	952	0
6	8700	3045	0	4524	0	1131	0
7	6100	3599	0	1586	0	915	0
8	8500	5015	0	2805	0	680	0
9	9600	3840	0	4512	0	1248	0
10	9600	3648	0	4512	0	1440	0
11	4200	1974	0	2100	0	126	0
12	8100	4212	0	3483	0	405	0
13	11400	5358	0	5814	0	228	0
14	11800	5900	0	5428	0	472	0
15	15700	6594	0	7693	314	1099	0
16	9800	3528	0	5586	0	686	0
17	10600	3286	0	4770	106	2438	0
18	16300	10595	0	4401	163	1141	0
19	9200	2944	0	5520	0	736	0
20	9300	2604	0	5580	0	1116	0
21	6700	1541	0	3953	67	1139	0
22	10500	4095	0	5880	210	315	0
23	3100	930	0	1953	62	155	0
24	3300	1584	0	1518	0	198	0
25	4300	1032	0	2365	43	860	0
26	4200	1596	0	1890	252	462	0
27	7600	1748	0	4332	608	912	0
28	4700	940	0	3384	329	47	0
29	6800	2992	0	2720	340	748	0
Mediana	8100	3286	0	3953	0	736	0
Mínimo-Máximo	3100-16300	930-10150	0-0	1518-7693	0-608	47-2438	0-0
Distribuição percentis (25%-75%)	5400-10150	1672-4088	0-0	2407-5474	0-186,5	350-1108	0-0

Tabela 6. Leucograma de vacas Nelore com microhematúria (Gmicro). Contagem de leucócitos totais (Leuc. totais, céls./mm<sup>3</sup>), neutrófilos segmentados (Neut. seg., céls./mm<sup>3</sup>), neutrófilos bastonete (Neut. bast., céls./mm<sup>3</sup>), linfócitos (céls./mm<sup>3</sup>), monócitos (céls./mm<sup>3</sup>), eosinófilos (céls./mm<sup>3</sup>) e basófilos (céls./mm<sup>3</sup>).

Animal	Leuc. totais	Neut. seg.	Neut. bast.	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
1	9700	5141	0	3589	0	970	0
2	13500	7155	0	5940	0	405	0
3	10800	6156	0	4320	0	324	0
4	10000	4600	0	4300	100	1000	0
5	10500	4830	0	4830	0	840	0
6	12000	5760	0	5400	0	840	0
7	11500	5520	0	4255	0	1725	0
8	15400	3850	0	9548	308	1694	0
9	12800	5248	0	6912	128	512	0
10	9900	4257	0	4356	198	1089	0
11	13400	6834	0	5762	134	670	0
12	6000	1260	60	3780	0	900	0
13	8500	2720	0	3995	595	1190	0
14	12000	4680	0	4680	960	1680	0
15	5800	2088	0	2726	348	638	0
16	7300	1898	0	3358	292	1752	0
17	14600	5256	0	8760	146	438	0
18	10200	4488	0	5202	0	510	0
19	9800	4018	0	4802	0	980	0
20	14600	9490	0	4672	0	438	0
21	4500	1530	0	2340	90	540	0
Mediana	10500	4680	0	4672	90	840	0
Mínimo-Máximo	4500-15400	1260-9490	0-60	2340-9548	0-960	324-1752	0-0
Distribuição percentis (25%-75%)	9100-13100	3285-5640	0-0	3888-5881	0-245	511-1140	0-0

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos séricos em vacas Nelore com macrohematúria (Gmacro). Proteína sérica total (PT, g/dL); albumina (g/dL); globulina (g/dL); atividade sérica das enzimas: aspartato transferase (AST, U/L), gama glutamiltransferase (GGT, U/L), e creatina quinase (CK, U/L); ureia (mg/dL); creatinina (mg/dL); haptoglobina (Hp, g/L).

Animal	PT	Albumina	Globulina	AST	GGT	CK	Ureia	Creatinina	Hp
1	5,90	2,90	3,00	57,90	12,40	258,10	17,90	0,6	0,444
2	6,00	2,50	3,50	53,40	12,90	81,30	15,10	0,7	0,262
3	6,50	2,70	3,80	100,90	22,90	100,80	17,10	0,5	0,384
4	6,90	3,30	3,60	92,60	18,60	265,20	19,60	1,40	0,325
5	6,30	2,90	3,40	95,10	19,90	262,30	19,00	1,50	0,334
6	8,40	3,70	4,70	83,30	20,10	176,70	25,20	1,90	0,569
7	6,60	2,90	3,70	97,80	15,20	327,60	18,70	1,20	0,395
8	7,40	2,90	4,50	109,90	33,70	231,80	15,10	1,70	0,363
9	7,60	3,10	4,50	103,10	27,20	166,00	11,80	1,60	0,376
10	7,70	3,30	4,40	98,60	20,80	178,90	8,80	1,40	0,475
11	6,20	2,80	3,40	91,30	16,80	935,90	13,10	1,50	0,383
12	8,10	2,90	5,20	84,60	29,20	286,30	9,60	1,00	0,927
13	8,20	3,40	4,80	97,30	22,20	597,40	43,10	2,80	0,48
14	7,1	3,20	3,90	70,80	22,90	219,10	19,00	1,60	0,423
15	8,7	3,70	5,00	134,40	60,30	393,30	20,70	1,50	0,505
16	8,1	3,30	4,80	101,60	17,80	419,90	32,50	1,60	0,479
17	7,2	4,30	2,90	154,60	39,40	429,70	28,30	0,50	0,501
18	7	3,3	3,7	64,50	26,00	178,4	12,5	1,7	0,6
19	7,6	3,1	4,5	126,90	22,60	169,6	14,1	1,1	0,706
20	7,4	3,6	3,8	97,20	17,00	304,4	17,1	1,5	0,872
21	6,8	2,9	3,9	69,60	17,10	103,8	33,9	1,1	0,663
22	9,5	2,7	6,8	64,30	21,10	195,1	25,9	1,4	0,556
23	7	2,7	4,3	69,30	18,00	73,5	26,2	0,9	0,638
24	7,3	3,2	4,1	99,50	21,00	126,1	16,7	1,2	1,56
25	5,9	2,2	3,7	172,80	28,70	84,1	10	0,7	0,366
26	7,5	3,2	4,3	62,70	35,10	115,5	17,8	0,9	0,764
27	6,8	3,1	3,7	83,60	38,90	100	17,5	1,1	0,426
28	6,8	3,4	3,4	207,60	25,00	161,2	17,8	0,8	0,482
29	7	2,7	4,3	72,90	24,50	331	15,9	0,9	0,366
Mediana	7,1	3,1	3,9	95,10	22,20	195,1	17,8	1,2	0,47
Mínimo-Máximo	5,9-9,5	2,2-4,3	2,9-6,8	53,4-207,6	12,4-60,3	73,5-935-9	8,8-43,1	0,5-2,8	0,26-1,56
Distribuição percentis (25%-75%)	(6,7-7,7	2,9-3,3	3,7-4,5	70,2-102,4	17,9-27,95	120,8-316	14,6-22,9	0,9-1,6	0,37-0,61

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos séricos em vacas Nelore com microhematúria (Gmicro). Proteína sérica total (PT, g/dL); albumina (g/dL); globulina (g/dL); atividade sérica das enzimas: aspartato transferase (AST, U/L), gama glutamiltransferase (GGT, U/L), e creatina quinase (CK, U/L); ureia (mg/dL); creatinina (mg/dL); haptoglobina (Hp, g/L).

Animal	PT	Albumina	Globulina	AST	GGT	CK	Ureia	Creatinina	Hp
1	8,10	2,90	5,20	90,10	29,00	147,80	15,80	1,20	0,436
2	9,3	3,00	6,30	146,90	16,50	304,30	14,80	1,30	0,749
3	8,70	3,20	5,50	112,10	28,10	152,50	13,60	1,50	0,581
4	9,30	2,70	6,60	87,00	16,50	125,90	12,00	1,10	0,443
5	8,60	3,50	5,10	132,80	33,00	207,40	22,10	1,60	0,462
6	7,8	3,60	4,20	107,30	11,80	362,60	16,00	1,30	0,976
7	7,8	3,2	4,6	96,50	25,40	87,8	14,9	1,7	0,471
8	7,6	3,6	4	102,80	18,90	235,9	24,7	2	0,433
9	7,7	3,4	4,3	77,90	15,70	48,6	14,4	1,3	0,612
10	5	2,2	2,8	60,40	20,20	96,6	15,1	1,2	0,751
11	8	3,3	4,7	79,00	21,90	242,1	27,9	1,3	0,519
12	7,6	2,7	4,9	107,20	134,20	116,9	35,7	1,3	0,45
13	8,4	3,2	5,2	103,40	105,90	129,5	21,6	1	0,751
14	7,5	3,3	4,2	83,80	27,00	147,5	17,7	1,5	0,508
15	6,7	3	3,7	126,50	34,80	109,8	13,6	0,9	0,625
16	7,2	3,7	3,5	60,70	37,90	164,3	28,4	1,3	0,612
17	7,60	3,70	3,90	70,90	17,70	187,50	28,10	1,20	0,768
18	7,90	3,10	4,80	95,20	27,40	222,50	19,40	1,50	0,729
19	6,8	3,6	3,2	85,70	24,20	234,9	20,2	1,5	0,512
20	8,2	3,6	4,6	146,80	56,90	342,3	15,5	1,6	0,571
21	7,8	2,9	4,9	74,20	22,30	140,9	27,8	1,1	0,64
Mediana	7,8	3,2	4,6	95,20	25,40	152,5	17,7	1,3	0,58
Mínimo-Máximo	5-9,3	2,2-3,7	2,8-6,6	60,4-146,9	11,8-134,2	48,6-362,6	12,0-35,7	0,9-2,0	0,43-0,97
Distribuição percentis (25%-75%)	7,6-8,3	2,9-3,6	3,9-5,2	78,4-146,9	18,3-33,9	121,4-235,4	14,9-26,3	1,2-1,5	0,46-0,73

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos séricos em vacas Nelore com microhematúria (Gmicro). Proteína sérica total (PT, g/dL); albumina (g/dL); globulina (g/dL); atividade sérica das enzimas: aspartato transferase (AST, U/L), gama glutamiltransferase (GGT, U/L), e creatina quinase (CK, U/L); ureia (mg/dL); creatinina (mg/dL); haptoglobina (Hp, g/L).

Animal	PT	Albumina	Globulina	AST	GGT	CK	Ureia	Creatinina	Hp
1	7,9	3,1	4,8	67,60	25,40	40,1	32,7	0,9	0,015
2	7,2	3,5	3,7	63,10	25,5	94,7	22,1	1,1	0,185
3	5,50	3,30	2,20	25,50	23,90	65,4	23,50	1,40	0,125
4	6,50	3,20	3,30	24,20	26,80	64,2	20,60	1,30	0,037
5	6,50	3,10	3,40	23,80	27,00	26,1	32,60	1,30	0,083
6	5,20	3,10	2,10	24,40	23,30	26	10,20	1,40	0,140
7	7,20	3,50	3,70	28,30	23,4	35,3	45,70	1,70	0,135
Mediana	6,50	3,20	3,4	25,50	25,40	37,7	23,50	1,30	0,120
Mínimo-Máximo	5,2-7,9	3,1-3,5	2,1-4,8	23,8-67,6	23,3-27	26-94,7	10,2-45,7	0,9-1,7	0,02-0,18
Distribuição percentis (25%-75%)	5,5-7,2	3,1-3,5	2,2-3,7	24,2-63,1	23,4-26,8	26-72,7	20,6-32,7	1,1-1,4	0,04-0,14

Tabela 10. Idade (anos) e cidade de origem das 57 vacas utilizadas no estudo, 29 com macrohematúria (Gmacro), 21 com microhematúria (Gmicro) e sete do grupo controle (Gc).

Gmacro			Gmicro			Gc		
Animal	Idade	Origem	Animal	Idade	Origem	Animal	Idade	Origem
1	6	Adrianópolis/PR	1	9	Rio Branco do Sul/PR	1	5	Nova Prata do Iguaçu/PR
2	8	Adrianópolis/PR	2	9	Rio Branco do Sul/PR	2	7	Nova Prata do Iguaçu/PR
3	9	Ribeira/SP	3	9	Rio Branco do Sul/PR	3	adulta	Botucatu/SP
4	4	Rio Branco do Sul/PR	4	6	Rio Branco do Sul/PR	4	adulta	Botucatu/SP
5	5	Rio Branco do Sul/PR	5	9	Rio Branco do Sul/PR	5	adulta	Botucatu/SP
6	5	Rio Branco do Sul/PR	6	9	Rio Branco do Sul/PR	6	adulta	Botucatu/SP
7	9	Rio Branco do Sul/PR	7	3	Rio Branco do Sul/PR	7	adulta	Botucatu/SP
8	3	Rio Branco do Sul/PR	8	4	Rio Branco do Sul/PR			
9	5	Rio Branco do Sul/PR	9	5	Rio Branco do Sul/PR			
10	3	Rio Branco do Sul/PR	10	3	Rio Branco do Sul/PR			
11	3	Rio Branco do Sul/PR	11	6	Doutor Ulysses/PR			
12	3	Rio Branco do Sul/PR	12	15	Doutor Ulysses/PR			
13	4	Rio Branco do Sul/PR	13	10	Bocaiuva do Sul/PR			
14	6	Rio Branco do Sul/PR	14	4	Bocaiuva do Sul/PR			
15	5	Rio Branco do Sul/PR	15	4	Bocaiuva do Sul/PR			
16	8	Rio Branco do Sul/PR	16	3	Bocaiuva do Sul/PR			
17	8	Rio Branco do Sul/PR	17	3	Rio Branco do Sul/PR			
18	5	Rio Branco do Sul/PR	18	6	Rio Branco do Sul/PR			
19	5	Rio Branco do Sul/PR	19	4	Rio Branco do Sul/PR			
20	5	Rio Branco do Sul/PR	20	5	Rio Branco do Sul/PR			
21	3	Doutor Ulysses/PR	21	3	Doutor Ulysses/PR			
22	3	Doutor Ulysses/PR						
23	12	Doutor Ulysses/PR						
24	8	Doutor Ulysses/PR						
25	8	Fazenda Rio Grande/PR						
26	12	Bocaiuva do Sul/PR						
27	3	Bocaiuva do Sul/PR						
28	9	Bocaiuva do Sul/PR						
29	6	Bocaiuva do Sul/PR						





**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 076/2016, referente ao projeto “**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BOVINOS COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA**”, sob a responsabilidade de **Ivan Roque de Barros Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 14/09/2016.


Vigência do projeto	Outubro/2016 até Setembro/2017
Espécie/Linhagem	<i>Bos</i> sp (bovino)
Número de animais	40
Peso/Idade	300 kg / Adulto
Sexo	Fêmea
Origem	Fazendas privadas da região metropolitana de Curitiba – PR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 076/2016, regarding the project “**SERUM BIOCHEMICAL PARAMETERS AND ACUTE PHASE PROTEIN IN CATTLE WITH BOVINE ENZOOTIC HEMATURIA**” under **Ivan Roque de Barros Filho** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 14/09/2016.

Duration of the project	October/2016 until September/2017
Specie/Line	<i>Bos</i> sp (bovine)
Number of animals	40
Weight/Age	300 kg / Adult
Sex	Female
Origin	Private farms in the metropolitan region of Curitiba – PR

Curitiba, 14 de setembro de 2016.

  
 Simone Tostes de Oliveira Stedile  
**Coordenadora CEUA-SCA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OFÍCIO Nº 129/2017

**Para: Ivan Roque de Barros Filho**

**Assunto: Protocolo 076/2016**

Prezado(a) pesquisador(a),

Após análise de sua solicitação, referente ao protocolo número 076/2016 intitulado “**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BOVINOS COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA**”, pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR, aprovamos a inclusão de 45 bovinos (fêmeas, adultas) para coleta de amostras de sangue, urina e fezes, e posterior avaliação de parâmetros bioquímicos séricos, hematológicos, urinários e coproparasitológicos.

Curitiba, 4 de dezembro de 2017.

Atenciosamente,

*Chayane da Rocha*

Chayane da Rocha

**Coordenadora CEUA SCA**

CIENTE:

Nome e assinatura do proponente

DATA: 04 / 12 / 2017